

Aus der Universitäts - Frauenklinik Erlangen

Direktor: Prof. Dr. med. R. Dyroff

---

# Beiträge zur Bestrahlung von Riboflavin

Inaugural - Dissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Hohen Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Alexander-Universität  
zu  
Erlangen

Vorgelegt von  
Adolf Rüfer aus Nürnberg

1956

1956 № 10



Aus der Universitäts-Frauenklinik Erlangen

Direktor: Prof. Dr. med. R. Dyroff

---

BEITRÄGE ZUR BESTRAHLUNG VON RIBOFLAVIN

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Friedrich - Alexander - Universität

zu

Erlangen

Vorgelegt von

Adolf Rüfer

aus Nürnberg



Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät der  
Universität Erlangen.

Dekan: Professor Dr. Carl Korth

Referent: Professor Dr. Rudolf Dyroff

Tag der mündlichen Prüfung: 8. März 1956

## G l i e d e r u n g.

|                                                                                                     | Seite |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <b>A. Allgemeiner Teil</b>                                                                          |       |
| 1. Einleitung und Problemstellung                                                                   | 4     |
| 2. Geschichtliches über Riboflavin                                                                  | 7     |
| 3. Eigenschaften                                                                                    | 9     |
| 4. Vorkommen                                                                                        | 12    |
| 5. Physiologische Bedeutung                                                                         | 13    |
| <b>B. Experimenteller Teil</b>                                                                      |       |
| I. Röntgen- und UV-Bestrahlung von Riboflavin                                                       | 17    |
| a) Versuchsanordnung                                                                                | 17    |
| b) Arbeitsmethode                                                                                   | 19    |
| c) Ergebnisse                                                                                       | 20    |
| II. Papierchromatographische Untersuchung der<br>Bestrahlungsprodukte                               | 27    |
| a) Arbeitsmethode                                                                                   | 28    |
| b) Ergebnisse                                                                                       | 29    |
| III. Bestrahlung von Riboflavinlösungen verschie-<br>dener Konzentrationen bei steigender Dosierung | 34    |
| IV. Bestrahlung von Riboflavin in Pufferlösungen                                                    | 50    |
| a) Arbeitsmethode                                                                                   | 50    |
| b) Ergebnisse                                                                                       | 52    |
| V. Abhängigkeit der Absorptionsmaxima und -minima<br>von der Dosis                                  | 61    |
| <b>C. Zusammenfassung</b>                                                                           | 64    |

Schon frühzeitig setzten nach Entdeckung der Röntgenstrahlen die Bemühungen ein, die Effekte der ionisierenden Strahlen in vivo und in vitro zu untersuchen. Bemerkenswerterweise wurden zunächst strahlenbiochemische Untersuchungen durchgeführt, über die z.B. KAILAN <sup>22 - 26</sup> berichtete. Während in den folgenden Jahren die biophysikalische Betrachtung der Wirkungsweise ionisierender Strahlen im Vordergrund stand, änderte sich dies anfangs der dreißiger Jahre. Seitdem hat die Strahlenbiochemie immer mehr an Bedeutung gewonnen. Es ist aber bis heute noch nicht gelungen, ein einheitliches Bild der Strahlenwirkung analog der Treffertheorie zu schaffen, obwohl die bisher durchgeführten Untersuchungen schon zu vielen wichtigen und aufschlußreichen Ergebnissen geführt haben (s. GEHRIG <sup>17</sup>, WOLFANGEL <sup>49</sup>). Aus diesem Grunde ist es auch weiterhin erforderlich, die für den Organismus wichtigen Substanzen in vivo und in vitro zu untersuchen. Besonders bedeutungsvoll können diese Untersuchungen im Hinblick auf einen aktiven, medikamentösen Strahlenschutz werden.

Neben Hormonen, Fermenten und anderen wichtigen Substanzen sind die Vitamine für den Stoffwechsel des Organismus von entscheidender Bedeutung. Aus diesem Grund lag es nahe, Vitamine, bzw. ihre wichtigsten Komponenten, im Hinblick

auf Veränderungen durch die Einwirkung ionisierender Strahlen zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, welche Veränderungen auftreten, wenn Vitamin B<sub>2</sub> (Riboflavin) in wässriger Lösung oder in Pufferlösungen mit Röntgenstrahlen bestrahlt wird. Um festzustellen, ob der Wirkungsmechanismus ionisierender Strahlen dem bekannten des UV-Lichtes gleicht oder ähnelt, wurden auch Bestrahlungen mit UV vorgenommen.

Bei eingehendem Studium der in- und ausländischen Literatur zeigte sich, daß über die Wirkung ionisierender Strahlen auf Vitamine nur wenige Veröffentlichungen vorliegen. Die ersten Arbeiten auf diesem Gebiet stammen von R.S. ANDERSON u. B.HARRISON<sup>1</sup> (Ascorbinsäure) und I.C.C. TCHAPEROFF<sup>44</sup> (Paraaminobenzoesäure). Die Wirkung sowohl harter wie auch weicher Röntgenstrahlen auf Riboflavin untersuchten B.E.PROCTOR u. S.E. GOLDBLITH<sup>40,41</sup>. Sie bestrahlten eine mit wenig Eisessig angesäuerte Riboflavinlösung in einer Konzentration von 10 mg USP Riboflavin in 100 ml Wasser. 2,5 ml dieser Lösung gelangten in einer kleinen Petrischale aus nichtrostendem Stahl zur Bestrahlung. Die Erzeugung der kurzwelligen Röntgenstrahlen, deren höchste Strahlungsintensität bei 0,008 Å lag, erfolgte mit einem Trump-Generator (3000 kV). Weiche Röntgenstrahlung erzeugten sie mit einer Grenzstrahlenröhre, die mit einer Scheitelspannung von 50 kV belastet wurde. Ihre Dosisleistung betrug 165000r pro Minute in einem Abstand

von 5 cm vom Fokus. Das erzeugte Röntgenspektrum reichte von 0,25 Å - 4,4 Å; die höchste Intensität lag bei 1,7 Å. Die Halbwertschicht im Wasser betrug bei gefilterter Strahlung 1,8 mm (Al-Filter 0,0026 Inch). Die Schichtdicke der Lösung betrug 1,52 mm. Riboflavin wurde fluorimetrisch bestimmt. Neben der quantitativen Bestimmung der bestrahlten Riboflavinlösungen mittels der fluorimetrischen Methodik wurde die Ausmessung der UV-Spektren durchgeführt. PROCTOR und GOLDBLITH fanden, daß Riboflavin durch harte Röntgenstrahlen zerstört wird. Die Zerstörung war um so größer, je verdünnter die Vitaminlösungen waren. Auf Grund der aufgenommenen UV-Absorptionsspektren nahmen sie eine Bildung von Lumichrom an, das durch einen Zerfall des Riboflavinmoleküls entstehen könnte. Bei Anwendung einer weichen Röntgenstrahlung stellten sie ebenfalls eine größere Strahlenempfindlichkeit von geringer konzentrierten Lösungen fest. Ferner fanden sie eine gewisse stabilisierende Wirkung von Ascorbinsäure und Oxalsäure auf Riboflavin.

## G e s c h i c h t l i c h e s .

Bereits im Jahre 1879 lenkte der wasserlösliche Farbstoff der Kuhmolke die Aufmerksamkeit auf sich. Diesen Farbstoff isolierte A.W.BLYTH<sup>6</sup> als rotorange gefärbtes Harz und bezeichnete ihn als Lactochrom. 1925 gewannen BLEYER u. KALLMANN<sup>5</sup> aus Milch ebenfalls Flavin in unreiner Form. Im Jahre 1933 isolierten KUHN u.a.<sup>33</sup> aus Eiweiß eine gelbgefärbte, stark gelbgrün fluoreszierende Verbindung. Diese nannten sie Ovoflavin. In Milch bzw. Molke und Leber (Hepatoflavin) wurden ähnliche Substanzen gefunden und bei Rattenversuchen ihre wachstumsfördernde Wirkung festgestellt. Unter dem Namen Lyochrome wurde die Gruppe dieser Farbstoffpräparate zusammengefaßt und es gelang, ihr Vorkommen in den verschiedensten Naturstoffen nachzuweisen 7,12,14,21,28,31,36,34.

KUHN und Mitarbeiter<sup>37</sup> konnten nachweisen, daß die aus Lactoflavin durch Bestrahlung erhaltene und als Lumiflavin bezeichnete Verbindung auch bei der Zerstörung des "gelben Fermentes" durch Licht entsteht. Ferner erkannten diese Autoren die Zusammenhänge zwischen den Lyochromen und dem von WARBURG<sup>46</sup> aus Hefe isolierten "gelben Ferment" (vgl. auch "Cytoflav" von BANGA<sup>2,3</sup> ).

Schon lange war das Vorkommen eines wasserlöslichen Wachstumsfaktors in Milch bekannt gewesen<sup>39</sup>. Durch seine Hitzestabilität und durch seine unterschiedliche physiologische Wirkung wurde seine Unterscheidung von dem Faktor B,<sup>13</sup>

möglich. Früher bezeichnete man diesen Wachstumsfaktor besonders in Amerika als Vitamin G . Nach der Isolierung des reinen Vitamins waren zwei Bezeichnungen gebräuchlich. Während Vitamin B<sub>2</sub> von den europäischen Forschern nach jenem Stoff, aus dem es zum erstenmal gewonnen wurde, nämlich der Milch, den Eigennamen Lactoflavin erhielt, wird es von den Amerikanern bzw. in den angelsächsischen Ländern wegen seines Ribosegehaltes R i b o f l a v i n genannt. Die internationale Nomenklaturkommission hat sich neuerdings für die Annahme der Bezeichnung Riboflavin ausgesprochen. Von KARRER und Mitarbeitern <sup>15,30,38</sup> wurde die Konstitution des Vitamins B<sub>2</sub> aufgeklärt und durch Synthese bewiesen.

## Eigenschaften von Riboflavin.

Riboflavin kristallisiert in orangegelben Nadelchen, die bei  $292 - 293^{\circ}$  schmelzen. In reinem Wasser löst sich Riboflavin zu 0,025%. In Alkohol ist die Löslichkeit noch geringer als in Wasser. In Äther, Benzol, Benzin und Chloroform ist Riboflavin vollkommen unlöslich. Der Geschmack der Lösungen ist intensiv bitter. Riboflavin und Riboflavinphosphorsäure haben gelbgrüne Fluoreszenz. Diese ist pH-abhängig und für Riboflavin zwischen pH 4 - 8 maximal. Sie ist charakteristisch für das elektrisch neutrale Molekül. Flavinanionen und -kationen fluoreszieren nicht.

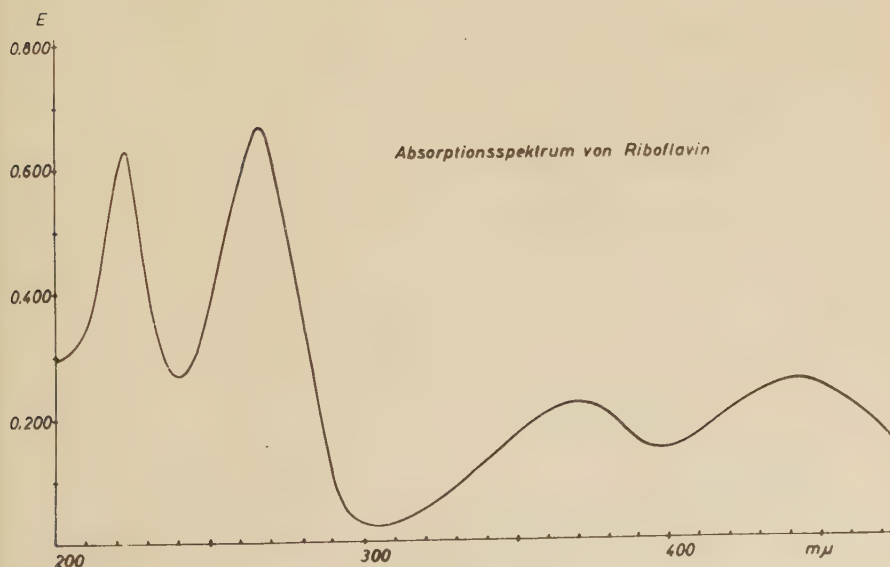
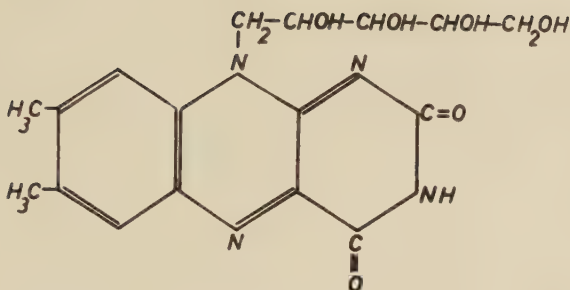


Abb. 1

Riboflavin besitzt ein charakteristisches Absorptionsspektrum, dessen Maxima bei 445, 372, 270 und 225 m $\mu$  liegen.<sup>32</sup> Diese Kurven ergeben, von geringen Verschiebungen abgesehen, fast alle Flavine. Einen gewissen Einfluß auf die Absorption haben besonders die im Benzolkern haftenden Methylgruppen. Abbildung 1 zeigt das Absorptionsspektrum des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Riboflavinpräparates ( gemessen im Beckman- Spektrophotometer DU, Konzentration der Lösung: 0,8 mg/100 ml, Lösungsmittel: aqua bidest., Schichtdicke: 1,00 cm ).

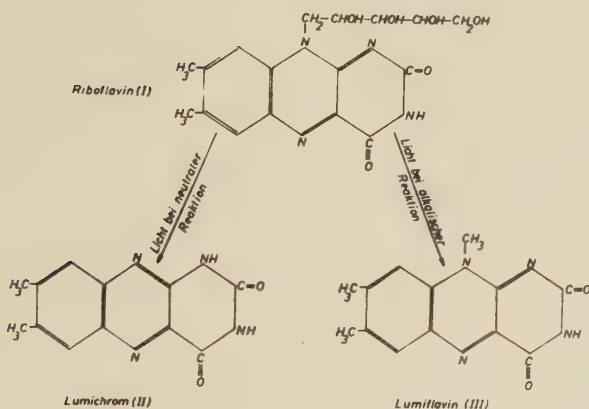
Riboflavin ist in neutraler und saurer Lösung hitzebeständig. Auch gegen Oxydationsmittel ( Brom, Salpetersäure, salpetrige Säure, Wasserstoffsuperoxyd ) ist es außerordentlich beständig. Stärkere Säuren zerstören selbst in der Wärme kaum. Durch Alkalien wird Riboflavin, besonders in der Wärme, rasch zerstört. Dabei wird die Farbe aufgehellt. Eine wässrige Lösung von pH = 8,7 verliert nach einstündigem Erhitzen auf 100° die Hälfte der physiologischen Wirksamkeit.

Konstitution von Riboflavin: Dem Riboflavin kommt die Bruttoformel C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> zu. Riboflavin ( I ) geht bei Belichtung in alkalischer Lösung unter Abspaltung der hydroxylhaltigen Seitenkette in das chloroformlösliche Lumiflavin ( III ) über.<sup>47</sup> Lumiflavin ist wie die anderen Flavine orangegelb gefärbt und fluoresziert gelbgrün. In neutraler oder schwachsaurer Lösung wird bei längerer Einwirkung von Licht



**Riboflavin (I)**

# Strukturformel von Riboflavin



## Lichtabbau von Riboflavin

die ganze Seitenkette des Flavins unter Bildung von Lumichrom ( II ) abgespalten<sup>27</sup> (siehe Formeln ). Lumichrom ist gelb und zeigt in Lösung eine blaugrüne Fluoreszenz. (vergl. VOGEL<sup>45</sup>).

# V o r k o m m e n .

Freies Riboflavin findet man in größeren Mengen nur in der Milch, dem Harn des Menschen und in den Netzhäuten von Fischen . Die Netzhaut des Dorsches ist mit einem Riboflavingehalt von 50mg% das Vitamin B<sub>2</sub>-reichste Organ, das wir kennen.

In viel größerem Ausmaße kommen Riboflavin und Riboflavinphosphorsäure in Bindung an Proteine vor. Über die Verbreitung im menschlichen Organismus gibt folgende Tabelle Aufschluß <sup>20</sup>:

Riboflavingehalt menschlicher Organe

| γ Flavin je<br>Gramm Frischgew. |      | γ Flavin je<br>Gramm Frischgew. |     |
|---------------------------------|------|---------------------------------|-----|
| Herz .....                      | 8,3  | Magen .....                     | 5,2 |
| Leber .....                     | 16,0 | Ileum .....                     | 4,2 |
| Hirn .....                      | 2,5  | Colon .....                     | 2,1 |
| Lunge .....                     | 1,9  | Brustdrüse .....                | 2,4 |
| Niere .....                     | 20,0 | Ovarium .....                   | 4,3 |
| Milz .....                      | 3,6  | Hoden .....                     | 2,0 |
| Skelettmuskel .....             | 2,0  | Samenleiter .....               | 1,0 |
| Glatte Muskel .....             | 2,3  | Haut .....                      | 1,2 |
| Nebenniere .....                | 8,2  |                                 |     |

Der Riboflavingehalt des Blutes beträgt ca. 280-300 γ /100g (Gesamtblut); 3,5-4,0 γ /100g (Serum)<sup>8</sup> ; 25 γ /100g (Erythrozyten); 250-260 γ /100g (Leukozyten).

### Physiologische Bedeutung.

Riboflavin, in freier Form und in Verbindungen, ist im Pflanzen- und Tierreich sehr weit verbreitet. Niedere und höhere Pflanzen können Riboflavin synthetisieren. Der Pilz *Eremothecium ashbyii* produziert bei geeigneter Zusammensetzung des Nährbodens soviel Riboflavin, daß es direkt in der Nährlösung auskristallisiert<sup>42</sup>. Die Abhängigkeit der Flavinbildung vom Nährsubstrat wird auch bei *Aspergillus niger* sehr deutlich; bei Mg-Mangel wird mehr Flavin gebildet als bei Anwesenheit von viel Magnesium. Der *Bacillus Pseudomonas fluorescens* scheidet ebenfalls beträchtliche Mengen Riboflavin in die Nährlösung aus<sup>4</sup>.

Flavinbildung durch Darmbakterien wurde bei Rindern, Schafen, Ratten, Geflügel und dem Menschen festgestellt. Jedoch vermag diese Menge den Organismus nicht vor Flavinmangel zu schützen. Ein erwachsener Mensch hat einen täglichen Bedarf an Riboflavin von etwa 2 mg.

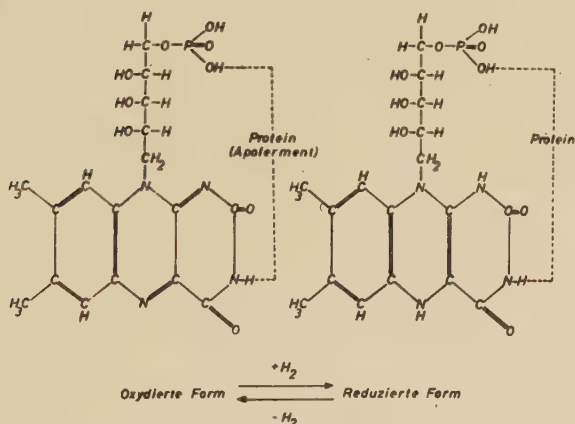
Der im Rattenversuch durch Mangel an Vitamin B<sub>2</sub> hervorgerufene Wachstumsstillstand kann durch Riboflavin beseitigt werden. Der Wachstumseffekt von Flavin hat zum größten Teil seine Ursache darin, daß es die Vorstufe bei der Bildung gelber Fermente im Organismus ist.

Riboflavin ist unentbehrlich für die normale Augenlinse, in der es insbesondere hoher Konzentration vorkommt. Ratten, in deren Kost es fehlt, erkranken an Katarakt<sup>10</sup>. Ihre Augenlin-

sen sind praktisch riboflavinfrei. Freies Riboflavin bzw. sein Phosphorsäureester haben wichtige Funktionen beim Sehvorgang zu erfüllen. Sie kommen im Pigmentepithel der Retina, in der Linse und der Hornhaut vor. Kurzwellige Strahlen verwandeln sie in gelbgrünes Fluoreszenzlicht, also in Licht von Wellenlängen, für die das menschliche Auge maximal empfindlich ist. Mit dieser Umwandlung des blauen Tageslichtes in gelbgrünes Fluoreszenzlicht ist gleichzeitig ein sog. Abschirmeffekt ( screening effect ) verknüpft, der das Auge, vor allem die Schleimhäute, vor dem Reiz des kurzwelligen Lichtes schützt <sup>43</sup>. Zum Aufbau des Hämanteiles des Blutfarbstoffes ist Riboflavin notwendig <sup>13</sup>. Bei anämischen Hunden tritt nach Verabreichung von Flavin rasch Hämoglobinbildung ein.

Riboflavin ist die Vorstufe bei der Bildung gelber Oxydationsfermente im Organismus. Es bildet als Phosphorsäureester die prosthetische Gruppe des gelben Atmungsfermentes, des zuerst gefundenen Vertreters einer ganzen Reihe von Oxydationsfermenten, die sich aber vom WARBURGschen Atmungsferment <sup>46</sup> im Bau der prosthetischen Gruppe unterscheiden und gegenüber dem WARBURGschen Oxydationsferment eine viel größere Aktivität aufweisen. Die prosthetische Gruppe dieser Fermente ist ein Adenindinucleotid, bei dem das Riboflavin in 5-Stellung mit einer Pyrophosphatgruppe verbunden ist, die ihrerseits über die 5-Stellung des Riboserestes mit dem Adenosin verknüpft ist. Die Wirkung aller dieser Atmungsfermente ist im Prinzip die gleiche wie beim zuerst gefundenen Atmungsferment von Warburg und besteht in einer reversiblen Oxydierbarkeit und

Reduzierbarkeit (siehe Formeln): sie bilden ein sog. Redox-System. Zu den gelben Oxydationsfermenten gehören die d-Aminosäureoxydase, die Diaphorasen und die Cytochrom-c-Reduktase.



Riboflavin als Coferment des WARBURGschen Atmungsfermentes. Formel nach KUHN.

Die Symptome des Riboflavinmangels beim Menschen machen sich vor allem am Munde, an Zunge, Nase und Augen bemerkbar, außerdem kann auch eine allgemeine Schwäche und Dermatitis eintreten. Rhagaden, gelbliche Borken an der Lipenschleimhaut, Mundwinkelfissuren und Glossitis können durch Riboflavingaben geheilt werden.

Nach den heutigen Erfahrungen ist Riboflavin völlig ungiftig. Selbst das 5000fache der therapeutischen Dosis (d.h. 340mg/kg) hat sich für die Maus als harmlos erwiesen. 20g pro Tag sind für einen 70kg schweren Menschen unschädlich <sup>11</sup>.

(vergl. HOPPE-SEYLER<sup>20</sup>)

### Versuchs anordnung.

Die Röntgenstrahlung wurde mit Hilfe einer Tiefentherapie-  
röhre (Siemens-Reiniger, Typ EW-220 ö ) erzeugt, derer  
Eigenfilterung 2,2 mm Al betrug. Eine zusätzliche Fil-  
terung erfolgte nicht. Die Röhre wurde mit 200 kV und  
20 mA belastet ( HWS 0,275 mm Cu ). Die eingestrahlte Do-  
sis betrug in 7 cm Entfernung vom Fokus 9600 r/min.

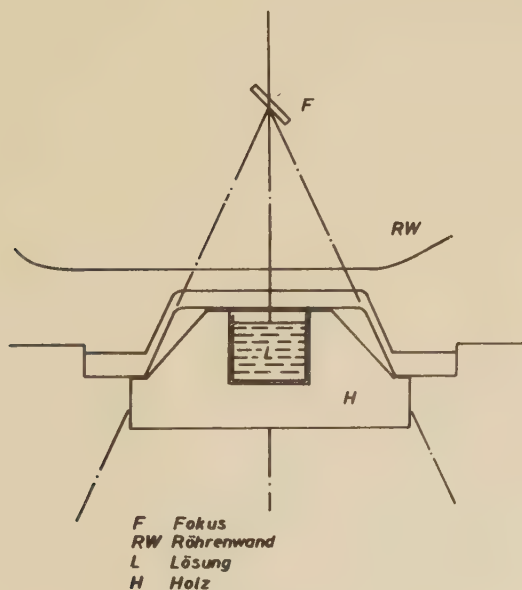


Abb. 2

Es wurden jeweils 5 ml der Vitaminlösung bestrahlt. Das  
hierzu verwendete Glasgefäß hatte einen Durchmesser von  
24 mm und war 23 mm tief. Es steckte in der Bohrung eines ge-

drechselten, hölzernen Klotzes, der fest unter der Röhre angebracht werden konnte. Der Fokus-Oberflächenabstand war regelmäßig 7 cm. Die Schichtdicke der Lösung betrug 20 mm. Aus Abbildung 2 ist die Lage des mit Lösung gefüllten Glasgefäßes zum Fokus ersichtlich.

Dosierung der Röntgenstrahlen: Es handelt sich bei allen r-Werten um Einfalldosen ( ED ). Die kleinste angewandte Dosis war 3000 r. Die nächsthöhere Dosis war jeweils doppelt so hoch als die vorausgegangene (siehe Tabelle).

|        | ED      | Zeit         | ED       | Zeit   |
|--------|---------|--------------|----------|--------|
| 200 kV | 3000 r  | 18,75 sec    | 48000 r  | 5 min  |
| u.     | 6000 r  | 37,50 sec    | 96000 r  | 10 min |
| 20 mA  | 12000 r | 1 min 15 sec | 192000 r | 20 min |
|        | 24000 r | 2 min 30 sec | 384000 r | 40 min |

In dem oben beschriebenen Gefäß erfolgte auch die Bestrahlung mit UV-Licht. Als Strahlungsquelle diente eine Quarz-Analysenlampe ( "Hanau" S 81 ) ohne Zusatzfilter. Der Abstand von der Lösungsoberfläche bis zum Brennpunkt der Lampe betrug konstant 30 cm. Eine Erwärmung der Lösung während der Bestrahlung konnte nicht festgestellt werden.

Dosierung bei UV-Bestrahlung: Abstand von der Lösungsoberfläche bis zum Brennpunkt der Lampe = 30 cm. Dauer der Bestrahlung: 40, 60, 80, 100 und 120 Minuten.

Ein Beckman Spektrophotometer, Modell DU, wurde zur Bestimmung der UV-Absorptionsspektren verwendet (Schichtdicke: 1,00 cm).

#### Arbeitsmethode.

Sämtliche Versuche erfolgten mit einem Riboflavinpräparat (Vitamin B<sub>2</sub>) der Firma E. MERCK. Vor jeder Bestrahlung wurde eine neue Vitaminlösung angesetzt, um Zersetzungen durch Sauerstoffeinfluß und Lichteinwirkung auszuschließen. Die Lösung enthielt 0,8 mg / 100 ml aqu. bidest., d.h. 8 γ Riboflavin auf 1 ml. Der pH-Wert dieser Lösung betrug 5,60 gegen Glaselektrode gemessen. Zur Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration diente das Philips pH-Meßgerät GM 4491. Um möglichst nur die reine Strahlenwirkung auf die Vitaminlösungen zu erfassen, wurde auf Zusatz von Stabilisatoren, wie Eisessig, Oxalsäure u.a. verzichtet. Von den Vitaminlösungen wurden jeweils Proben von 5 ml mit einer Pipette entnommen, in einem auf Seite 17 beschriebenen Glasgefäß zur Bestrahlung gebracht und unmittelbar danach im Beckman Spektrophotometer ausgemessen. Um eine höhere Strahlenempfindlichkeit bei Vitaminlösungen geringerer Konzentration nachzuweisen, wurden Proben von verschiedenem Riboflavingehalt untersucht:

- |                            |                              |
|----------------------------|------------------------------|
| I. 0,4 mg/100 ml = 4 γ/ml  | III. 1,2 mg/100 ml = 12 γ/ml |
| II. 0,8 mg/100 ml = 8 γ/ml | IV. 1,6 mg/100 ml = 16 γ/ml  |

## Ergebnisse der Röntgenbestrahlung.

(für wässrige Lsg.)

Die Bestrahlung erfolgte mit einer Riboflavinlösung, die 0,8 mg / 100 ml H<sub>2</sub>O enthielt. Anschließend wurden die UV-Spektren der bestrahlten Lösungen bestimmt. Die graphische Darstellung der UV-Spektren bestrahlter im Vergleich zu unbestrahlter Lösung zeigen Abbildungen 3 - 6.

Bei der Bestrahlung mit der Dosis 3000r (kleinste angewandte Dosis) zeigt sich bereits eine Veränderung im Spektrum von Riboflavin. Sämtliche vier Maxima sinken nahezu gleichmäßig ab, während die Minima einen leichten Anstieg erkennen lassen (Abb. 3). Das Spektrum der mit 6000r bestrahlten Lösung zeigt bereits einen etwas stärkeren Abbau der Maxima (Abb. 4). Bei der Dosis von 12000r ist das Maximum bei 445 m $\mu$  deutlich in den kurzwelligen Bereich des Spektrums verschoben (Abb. 4). Die Maxima bei 372 m $\mu$  und 445 m $\mu$  sind bei der Bestrahlung mit 24000r verschwunden; bei 415 m $\mu$  ist ein neues Maximum entstanden (Abb. 4). Hier fällt besonders die zunehmende Entfärbung der Vitaminlösungen auf, die mit dem Abbau des Maximums bei 445 m $\mu$  zusammenhängt. Bei Anwendung relativ hoher Dosen (48000 u. 96000r) erweist sich das Maximum bei 267 m $\mu$  gegenüber Röntgenstrahlen als sehr stabil (Abb. 5). Bei 192000r ist jedoch ein Reaktionsprodukt entstanden, das nur noch im kurzwelligen Bereich stark absorbiert (Abb. 5). Selbst mit der doppelten Dosis (384000r) konnte kein weiterer Effekt mehr erzielt werden. Es hat sich demnach ein vollkommen röntgenstrahlenunempfindliches Reaktionsprodukt gebildet (Abb. 6).

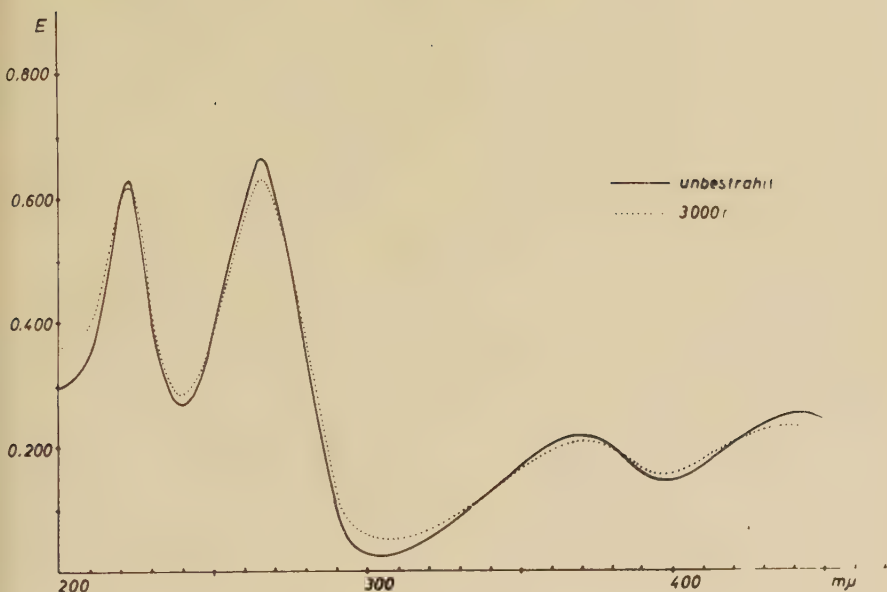


Abb. 3

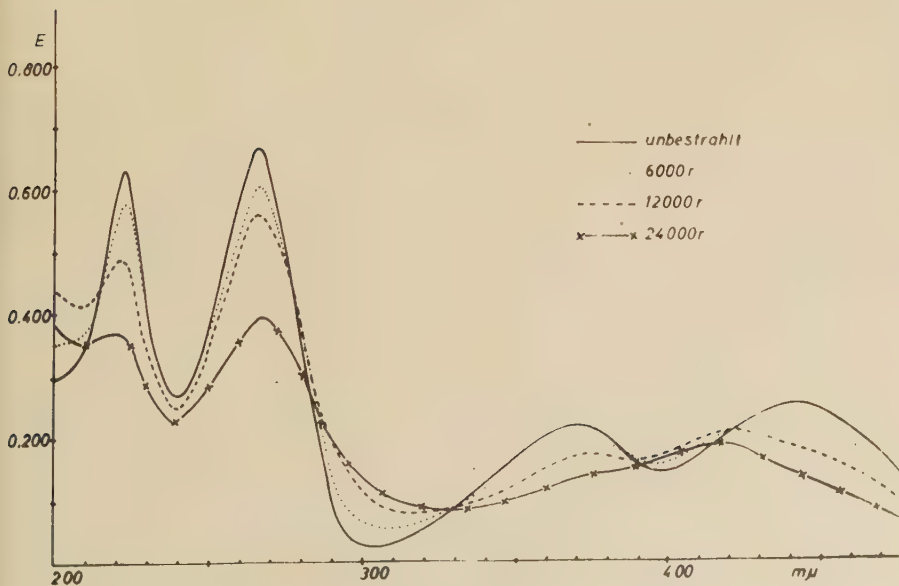


Abb. 4

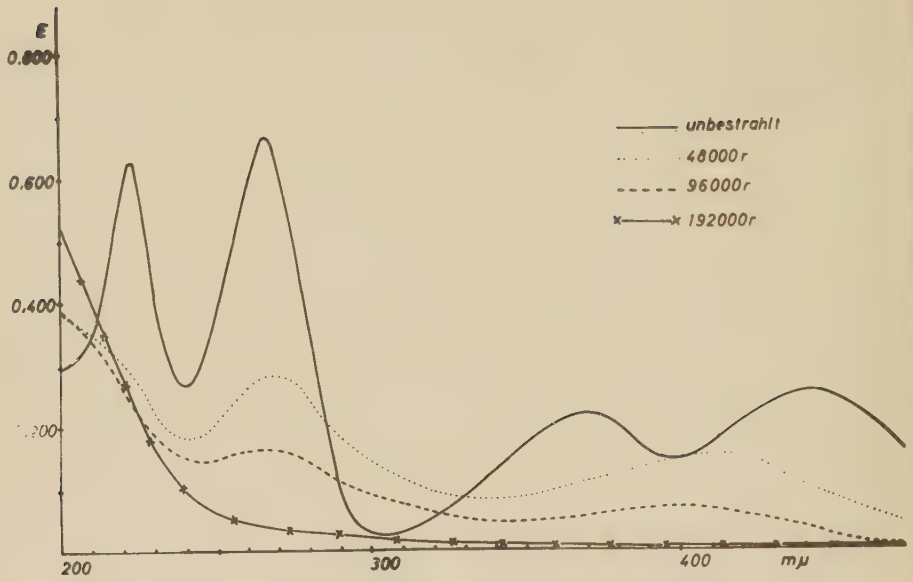


Abb. 5

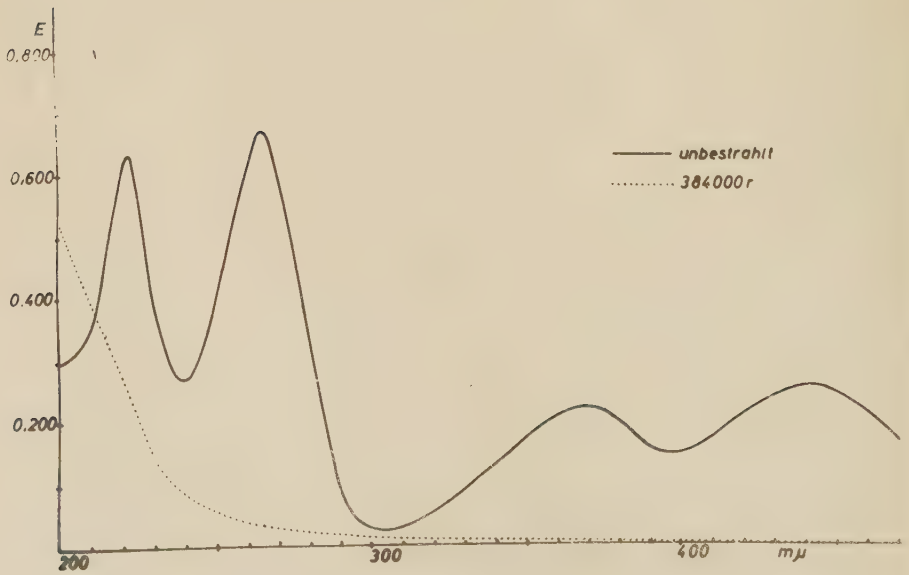


Abb. 6

Ergebnisse der UV-Bestrahlung.

(für wässrige Lsg.)

Die graphische Darstellung der UV-Spektren von unbestrahlten und UV-bestrahlten Vitaminlösungen zeigen Abbildungen 7 - 11.

Nach 40 Minuten Bestrahlung mit UV-Licht tritt im Spektrum der Riboflavinlösung bereits eine deutliche Veränderung ein. Es fällt hier besonders der relativ starke Abbau des Maximums bei  $445\text{ m}\mu$  auf (Abb. 7). Bei längerer Bestrahlung mit UV-Licht (60, 80, 100 u. 120 Minuten) wird diese langwellige Bande ungleich stärker abgebaut als die übrigen drei Maxima (Abb. 8, 9, 10 u. 11). Dies geht mit einer zunehmenden Entfärbung der Vitaminlösungen einher, wie dies auch schon bei der röntgenbestrahlten Lösung beobachtet wurde. Während die beiden Maxima bei  $223$  und  $267\text{ m}\mu$  neben einem systematischen Abbau eine geringe Verschiebung in den kurzwelligen Bereich erfahren, tritt bei längerer Dauer der Bestrahlung zwischen  $340$  und  $360\text{ m}\mu$  ein neues Maximum auf (Abb. 11). KARKER u. Mitarbeiter<sup>27</sup> fanden für das Spaltprodukt Lumichrom ebenfalls ein zweites Maximum in diesem Bereich.

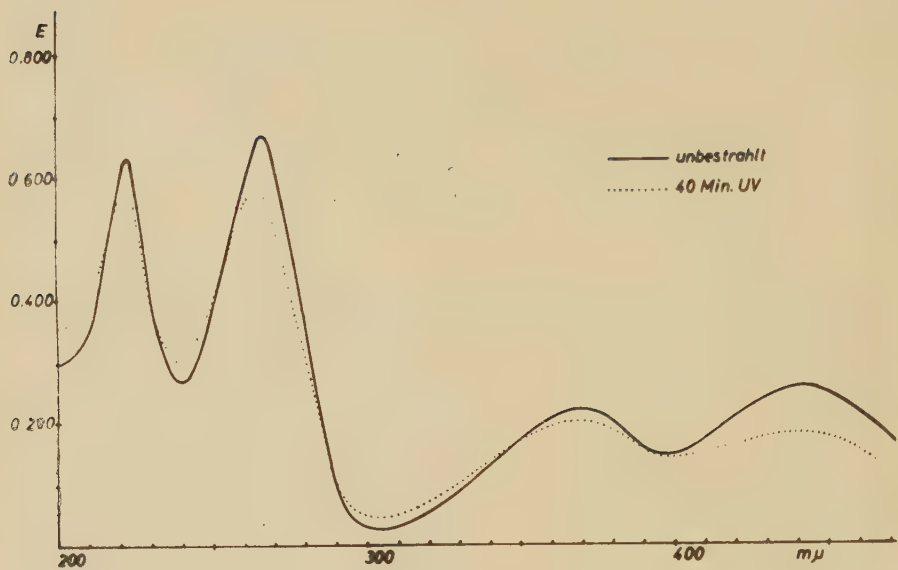


Abb. 7

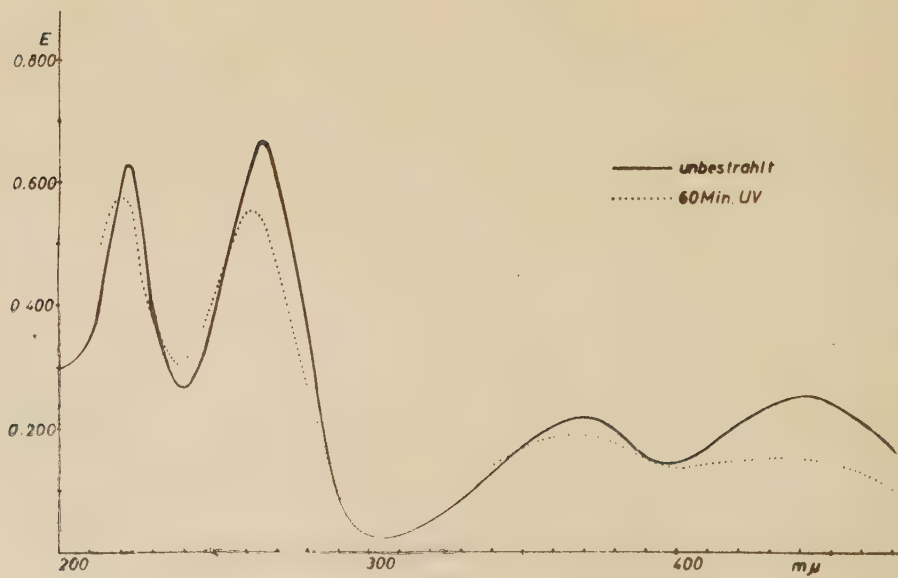


Abb. 8

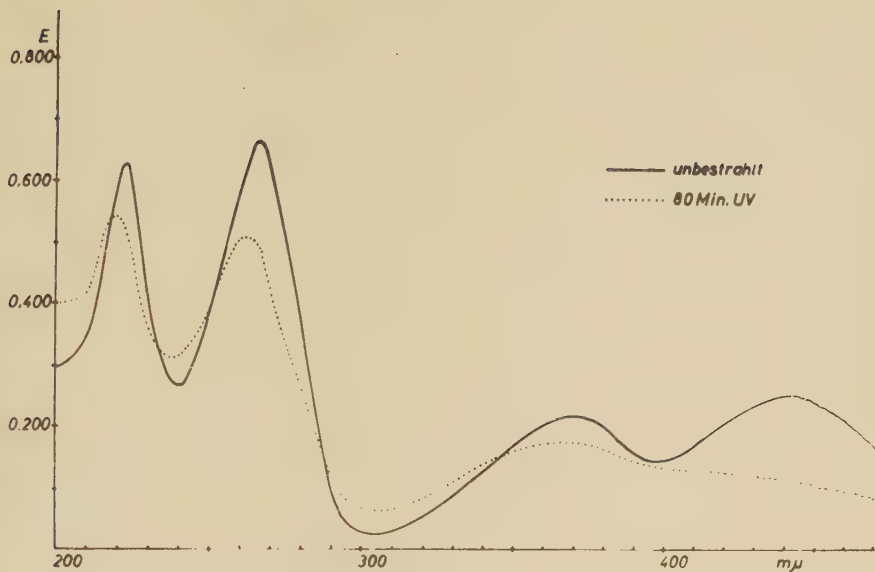


Abb. 9

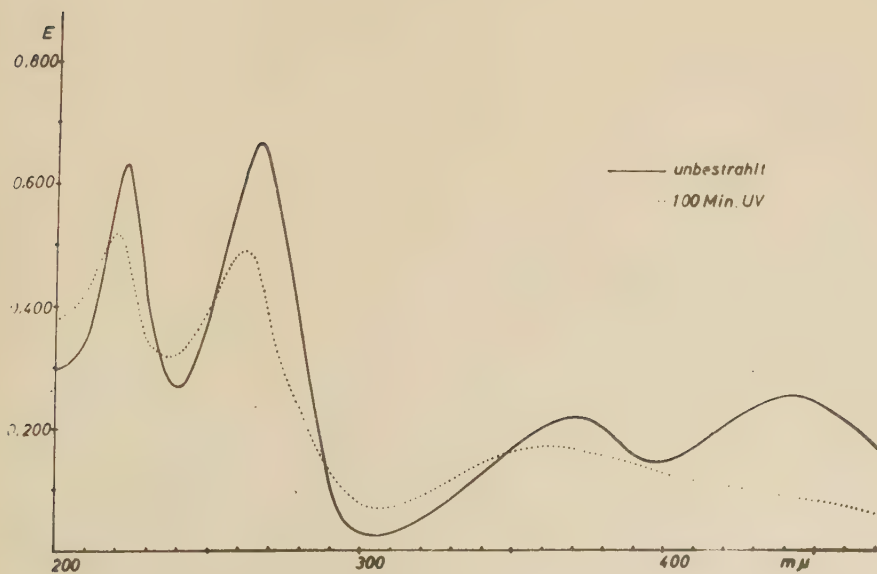


Abb. 10

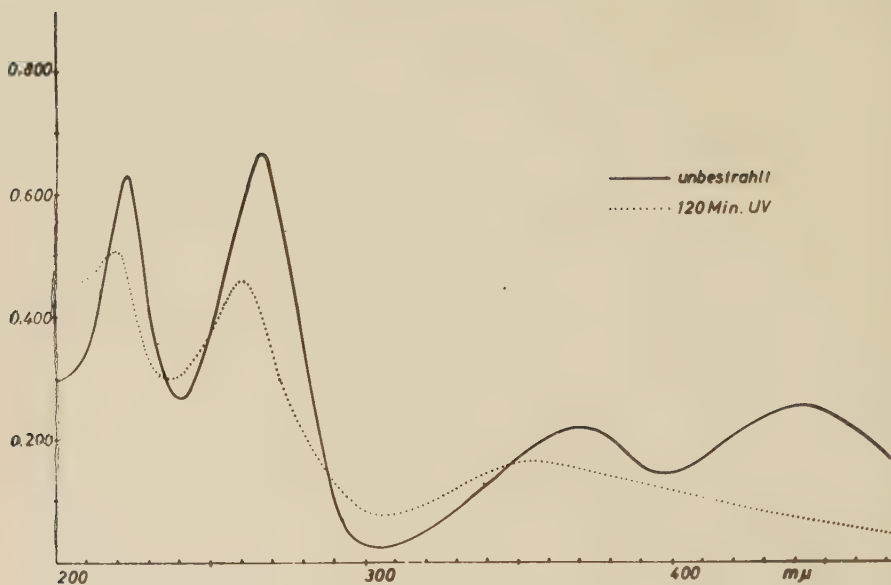


Abb. 11

## Papierchromatographische Untersuchung der Bestrahlungsprodukte.

Auf Grund der aufgenommenen Absorptionsspektren konnten keine näheren Aussagen über die bei der Bestrahlung entstandenen Reaktionsprodukte gemacht werden. Es wurde daher versucht, zur Unterscheidung dieser Substanzen ihr papierchromatographisches Verhalten auszuwerten. Von Interesse war vor allem die Frage, ob ein Unterschied zwischen der Wirkung der Ultraviolettstrahlen und der Röntgenstrahlen besteht.

Mit der papierchromatographischen Trennung, der bei der Photolyse von Riboflavin entstandenen Verbindungen, beschäftigten sich I.M. HAIŠ und L.PEČÁKOVÁ<sup>19</sup>. Sie arbeiteten im wesentlichen nach der von J.L.CRAMMER<sup>9</sup> entwickelten Methode. Die von ihnen gefundenen Ergebnisse sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt:

### $R_F$ -Werte von Flavinen.

| Flavine    | Lösungsmittel: n-Butanol, Essigsäure u. Wasser<br>( 4 : 1 : 5 ) Whatman-Papier Nr. 1 |      |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------|
|            |                                                                                      |      |
| Riboflavin |                                                                                      | 0,30 |
| Lumiflavin |                                                                                      | 0,40 |
| Lumichrom  |                                                                                      | 0,70 |

### A r b e i t s m e t h o d e .

Die verschiedenen Lösungen des reinen und des bestrahlten Riboflavin wurden mit einer Blutzuckerpipette auf SCHLEICHER u. SCHÜLL-Papier Nr. 2043 b aufgetragen. Als Lösungsmittel diente ein Gemisch aus n-Butanol, Essigsäure und Wasser ( 4 : 1 : 5 ). Die Temperatur betrug 18 - 20° C, die Laufdauer 48 Stunden. Die Flecken wurden im gefilterten Licht einer Hanauer-Quarz-Analysenlampe nachgewiesen. Die Startlinie wurde 4 cm vom unteren Rand eines 50 • 10 cm großen Filterpapierstreifens aufgezeichnet. Da man bei jedem Versuch auch reine Riboflavinlösung zur Kontrolle mitlaufen ließ, wurde zwischen beiden Proben ein Abstand von 4 cm auf der Startlinie gewählt. Aus 7 Startpunkten entstand nach Eintrocknung der Lösung ein geschlossener Startstreifen. Auf jeden Startpunkt wurden 5 Tropfen von 0,01 ml aufgebracht. Da die Konzentration der unbestrahlten Lösung 8000  $\gamma$  / 100 ml betrug, trafen auf einen Startpunkt 4,0 . Auf einen Startstreifen wurden also 28  $\gamma$  Riboflavin aufgetragen ( unbestrahlte Lösung ). Um Lichteinflüsse auszuschalten, wurden die Glaszylinder, in denen sich die Papierstreifen während der 48stündigen Laufzeit befanden, mit einer schwarzen Papierumhüllung abgedichtet. Nach beendeter Laufzeit wurden die Streifen herausgenommen und mit kaltem Föhn getrocknet.

# Ergebnisse.

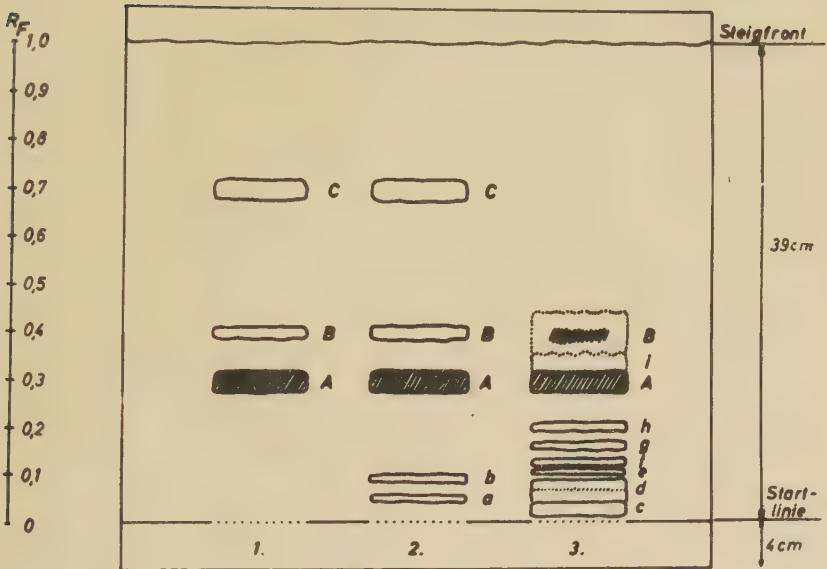


Abb. 12

Zusammenstellung der gefundenen  $R_F$ -Werte:

1. Vergleichslösung und 2. UV-bestrahlte Lösung

| Flecken | $R_F$ - Werte |             | Farbe             | Spalt-<br>produkt |
|---------|---------------|-------------|-------------------|-------------------|
|         | Vergl. Lösg.  | 180 Min. UV |                   |                   |
| a       |               | 0,05        | violett           |                   |
| b       |               | 0,09        | hellblau          |                   |
| A       | 0,30          | 0,30        | gelbgrün          | Riboflavin        |
| B       | 0,40          | 0,40        | rötlich-<br>braun | Lumiflavin        |
| C       | 0,70          | 0,70        | grünlich-<br>blau | Lumichrom         |

### 3. Röntgenbestrahlte Lösung:

| Flecken        | $R_F$ - Wert | Fluoreszenzfarben im UV-Licht |
|----------------|--------------|-------------------------------|
| c <sub>1</sub> | 0,00         | grün                          |
| c <sub>2</sub> | 0,02         | hellblau                      |
| c <sub>3</sub> | 0,03         | grün                          |
| d <sub>1</sub> | 0,05         | hellblau                      |
| d <sub>2</sub> | 0,07         | violett                       |
| e              | 0,11         | hellblau                      |
| f              | 0,13         | grüngelb                      |
| g              | 0,16         | hellblau                      |
| h              | 0,20         | rötlich-gelb                  |
| A              | 0,30         | gelbgrün                      |
| i              | 0,35         | gelbbraun                     |
| B              | 0,40         | gelbbraun                     |

Bei Betrachtung der Streifen im Tageslicht konnte folgendes festgestellt werden:

Bei dem Startstreifen 1 (Abb. 12) wanderte das reine Riboflavin mit einem  $R_F$ -Wert von 0,30 in Form eines Rechtecks. Der gefundene Wert stimmt mit dem von P.KARRER u.W.FORTER<sup>16</sup> und L.G.WHITBY<sup>48</sup> überein. Im Gegensatz zu der reinen Riboflavinlösung zeigte die röntgenbestrahlte und die UV-bestrahlte Lösung eine deutliche Abnahme des gelben Riboflavinfleckens bei  $R_F$  0,30.

Unter dem UV-Licht der Quarz-Analysenlampe bot sich ein weitaus vielfältigeres Bild: (Abbildung 12)

1. Unbestrahlte Lösung des reinen Riboflavin: Hier waren drei deutlich fluoreszierende Flecken nachzuweisen und zwar der schon bei Tageslicht sichtbare in intensivgelber Farbe ( A:  $R_F$  0,30 ); es handelt sich hier um das reine Riboflavin. Der folgende Flecken B war gelblichbraun; sein  $R_F$ -Wert 0,40 entspricht dem Lumiflavin. Der letzte Flecken C mit einem  $R_F$ -Wert von 0,70 fluoreszierte grünlichblau, entsprechend dem Spaltprodukt Lumichrom.
2. UV-bestrahlte Lösung (bestrahlte Menge: 5 ml, Bestrahlungszeit: 180 Minuten): Folgende Flecken - mit steigendem  $R_F$ -Wert angeordnet - konnten sichtbar gemacht werden:
  - a)  $R_F$  0,05, Farbe: violett.
  - b)  $R_F$  0,09, Farbe: hellblau.
  - A) Der dem Riboflavin entsprechende Flecken (  $R_F$  0,30 ) fluoreszierte nicht mehr so intensiv wie der des unbestrahlten Vitamins ( Farbe: gelbgrün ).
  - B)  $R_F$  0,40, Farbe: gelblichbraun (Lumiflavin ). Dieser Flecken zeigte eine hellblaue Schwanzbildung.
  - C)  $R_F$  0,70, Farbe: grünlichblau (Lumichrom ). Dieser Flecken war bedeutend größer als der entsprechende der unbestrahlten Probe und zeigte auch eine stärkere Fluoreszenz.

### 3. Röntgenbestrahlte Lösung ( 192000 r ED bei 200 kV und 20 mA, Zeit: 20 Minuten ).

Es trat hier eine große Anzahl von Flecken mit niedrigen  $R_F$ -Werten und verschiedenfarbiger Fluoreszenz auf. Diese nachfolgend beschriebenen Flecken waren reproduzierbar und verdienen deshalb eine ausführliche Schilderung:

|                        |      |                  |                                |
|------------------------|------|------------------|--------------------------------|
| c <sub>1</sub> ) $R_F$ | 0,00 | Farbe: grün      |                                |
| c <sub>2</sub> ) $R_F$ | 0,02 | " : hellblau     |                                |
| c <sub>3</sub> ) $R_F$ | 0,03 | " : grün         |                                |
| d <sub>1</sub> ) $R_F$ | 0,05 | " : hellblau     | Grenze zwischen d <sub>1</sub> |
| d <sub>2</sub> ) $R_F$ | 0,07 | " : violett      | u. d <sub>2</sub> ist unscharf |
| e) $R_F$               | 0,11 | " : hellblau     |                                |
| f) $R_F$               | 0,13 | " : grüngelb     |                                |
| g) $R_F$               | 0,16 | " : hellblau     |                                |
| h) $R_F$               | 0,20 | " : rötlich-gelb |                                |

FORTER und KARRER <sup>16</sup> fanden, daß die  $R_F$ -Werte umso niedriger sind, je mehr Hydroxylgruppen das Flavin enthält und je weniger Alkylgruppen (  $CH_3$  ,  $C_2H_5$  ) in ihm vorkommen. Beide Faktoren erhöhen die Wasserlöslichkeit der Flavine und setzen die Löslichkeit im organischen Lösungsmittel, also in der mobilen Phase herab. Dies hat eine verminderte Wanderung zur Folge.

#### A) $R_F$ 0,30, Farbe: gelbgrün.

Riboflavin, das durch die Röntgenbestrahlung nicht mehr zerstört wurde, läßt sich in diesem Flecken nachweisen.

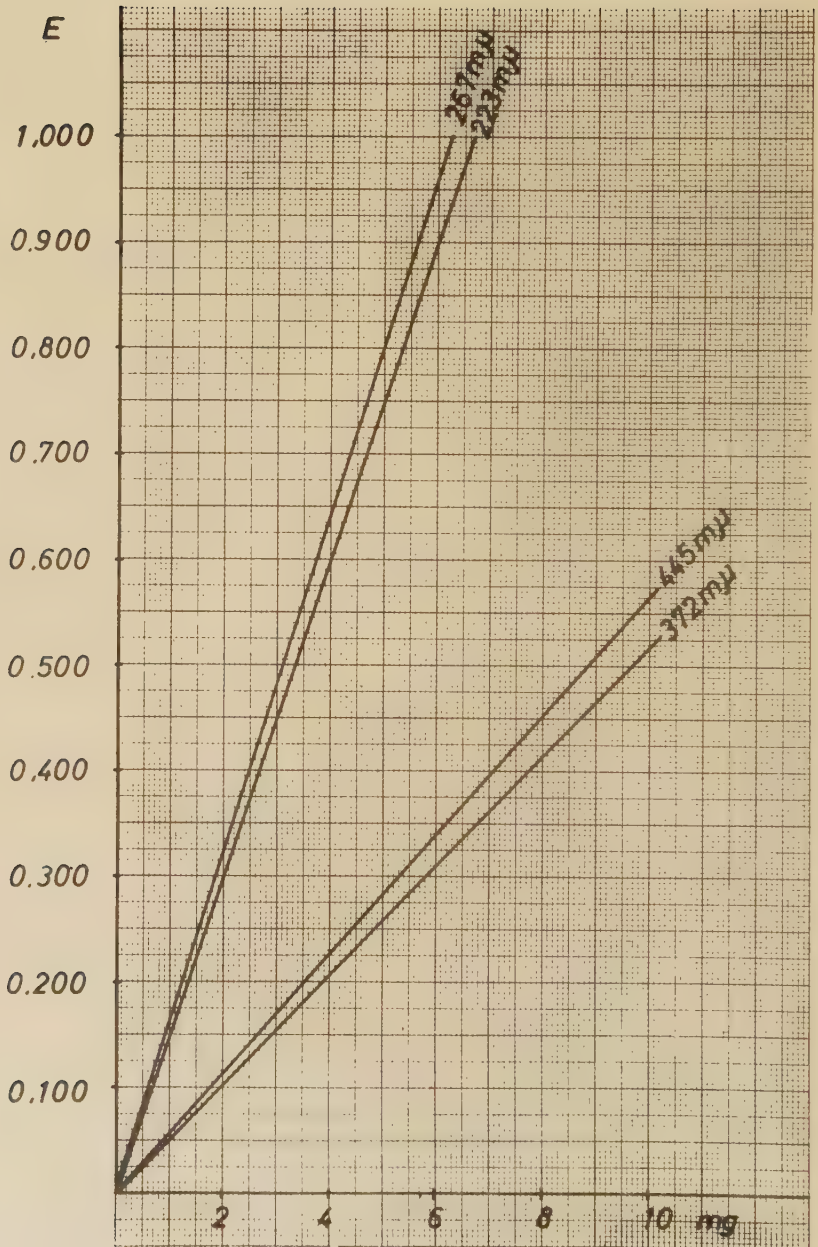
- 1)  $R_F$  0,35, Farbe: gelbbraun.
- B)  $R_F$  0,40, Farbe: gelbbraun, im Zentrum schwach gelblich fluoreszierend. Der gelb fluoreszierende Teil ist auch bei Tageslicht als blaßgelber Flecken zu erkennen. Sein  $R_F$ -Wert entspricht dem Lumiflavin.

Der bei der Vergleichslösung und der UV-bestrahlten Lösung auftretende Lumichromflecken (  $R_F$  0,70 ) konnte bei der röntgenbestrahlten Lösung nicht nachgewiesen werden.

Bestrahlung von Riboflavinlösungen verschiedener Konzen-  
trationen bei steigender Dosierung.

In einem Vorversuch wurde zunächst festgestellt, ob die Maxima innerhalb des angewandten Konzentrationsbereiches dem Lambert-Beer'schen Gesetz folgen. Nach Bestimmung der Extinktionswerte der vier Maxima bei verschiedenen Konzentrationen konnte festgestellt werden, daß die Zunahme der Extinktion proportional der Zunahme der Konzentration erfolgt, wie die graphische Darstellung (Eichkurve) auf Seite 36 zeigt. Selbstverständlich kann die Abnahme der Extinktion nach Bestrahlung der Lösung nicht als Maß für die Zerstörung des Vitamins genommen werden. Da aber die Veränderungen im Spektrum der bestrahlten Lösungen in einem bestimmten Bereich (Abb. 4 u. 5) einen gesetzmäßigen Zusammenhang erkennen lassen, ist jedoch mit Vorbehalt versucht worden, diese Ergebnisse quantitativ auszuwerten. Tabelle I zeigt die prozentuale Abnahme der Extinktion röntgenbestrahlter, Tabelle II die der UV-bestrahlten Lösungen. B.E.PROCTOR und S.A.GOLDBLITH<sup>40,41</sup> bestimmten die Zerstörung von Riboflavin in wässriger Lösung fluorimetrisch. Diese quantitative Bestimmungs- methode kann ebenfalls zu keinen zuverlässigen Ergebnissen führen, da sowohl nach Röntgen- als auch UV-Bestrahlung fluoreszierende Spaltprodukte auftreten, wie die papierchromatographischen Untersuchungen zeigten. Trotz der verschiedenen Wege die bestrahlten Riboflavinlösungen quantitativ auszuwerten, decken sich die in der vorliegenden

Arbeit gefundenen Ergebnisse in gewissen Punkten mit denen von PROCTOR und GOLDBLITH . Es wurde ebenfalls festgestellt, daß mit zunehmender Verdünnung der Vitaminlösungen eine größere Zerstörbarkeit einhergeht (Vergl. Tab. I u. II). Ferner fanden PROCTOR und GOLDBLITH nach Bestrahlung einer wässerigen Riboflavinlösung, die 10 $\mu$  / ml enthielt, bei Anwendung einer Dosis von 100000r eine Zerstörung von 68% des gelösten Riboflavins. Bei eigenen Untersuchungen wurde eine wässrige Riboflavinlösung, die 12 $\mu$ / ml enthielt, mit 96000r bestrahlt. Die prozentuale Abnahme der Extinktion betrug in diesem Falle 69% (Mittelwert aus den Extinktionskoeffizienten der vier Maxima, s. Tab. I)



Eichkurve

Tabelle I

$E_u$  Extinktion der unbestrahlten Lösung

$E_b$  Extinktion der bestrahlten Lösung

A% Abnahme der Extinktion in Prozent

| Wellenlänge     | Dosis: 3000 r   |       |    |                 |       |    |
|-----------------|-----------------|-------|----|-----------------|-------|----|
|                 | 0,4 mg / 100 ml |       |    | 0,8 mg / 100 ml |       |    |
|                 | $E_u$           | $E_b$ | A% | $E_u$           | $E_b$ | A% |
| Max. I<br>223   | 0,306           | 0,252 | 18 | 0,631           | 0,619 | 2  |
| Max. II<br>267  | 0,321           | 0,271 | 15 | 0,665           | 0,632 | 5  |
| Max. III<br>372 | 0,105           | 0,091 | 14 | 0,218           | 0,202 | 4  |
| Max. IV<br>445  | 0,121           | 0,099 | 13 | 0,250           | 0,233 | 7  |

| Wellenlänge     | Dosis: 3000 r   |       |    |                 |       |    |
|-----------------|-----------------|-------|----|-----------------|-------|----|
|                 | 1,2 mg / 100 ml |       |    | 1,6 mg / 100 ml |       |    |
|                 | $E_u$           | $E_b$ | A% | $E_u$           | $E_b$ | A% |
| Max. I<br>223   | 0,920           | 0,850 | 8  | 1,240           | 1,200 | 3  |
| Max. II<br>267  | 0,960           | 0,875 | 9  | 1,360           | 1,270 | 6  |
| Max. III<br>372 | 0,310           | 0,285 | 8  | 0,430           | 0,414 | 3  |
| Max. IV<br>445  | 0,360           | 0,321 | 11 | 0,494           | 0,470 | 5  |

| Wellen-<br>länge | Dosis: 6000 r   |                |    |                 |                |    |
|------------------|-----------------|----------------|----|-----------------|----------------|----|
|                  | 0,4 mg / 100 ml |                |    | 0,8 mg / 100 ml |                |    |
|                  | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% |
| Max. I<br>223    | 0,306           | 0,224          | 27 | 0,631           | 0,576          | 9  |
| Max. II<br>267   | 0,321           | 0,241          | 25 | 0,665           | 0,602          | 9  |
| Max. III<br>372  | 0,105           | 0,082          | 22 | 0,218           | 0,197          | 9  |
| Max. IV<br>445   | 0,121           | 0,086          | 29 | 0,250           | 0,219          | 12 |

| Wellen-<br>länge | Dosis: 6000 r   |                |    |                 |                |    |
|------------------|-----------------|----------------|----|-----------------|----------------|----|
|                  | 1,2 mg / 100 ml |                |    | 1,6 mg / 100 ml |                |    |
|                  | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% |
| Max. I<br>223    | 0,920           | 0,790          | 14 | 1,240           | 1,160          | 6  |
| Max. II<br>267   | 0,960           | 0,850          | 11 | 1,300           | 1,210          | 7  |
| Max. III<br>372  | 0,310           | 0,280          | 10 | 0,430           | 0,397          | 8  |
| Max. IV<br>445   | 0,360           | 0,314          | 13 | 0,494           | 0,450          | 9  |

| Wellen-<br>länge | Dosis: 12000 r  |                |    |                 |                |    |
|------------------|-----------------|----------------|----|-----------------|----------------|----|
|                  | 0,4 mg / 100 ml |                |    | 0,8 mg / 100 ml |                |    |
|                  | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% |
| Max. I<br>223    | 0,306           | 0,196          | 36 | 0,642           | 0,482          | 25 |
| Max. II<br>267   | 0,324           | 0,204          | 37 | 0,684           | 0,558          | 18 |
| Max. III<br>372  | 0,105           | 0,072          | 31 | 0,223           | 0,167          | 25 |
| Max. IV<br>445   | 0,121           | 0,073          | 40 | 0,257           | 0,179          | 30 |

| Wellen-<br>länge | Dosis: 12000 r  |                |    |                 |                |    |
|------------------|-----------------|----------------|----|-----------------|----------------|----|
|                  | 1,2 mg / 100 ml |                |    | 1,6 mg / 100 ml |                |    |
|                  | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% |
| Max. I<br>223    | 0,935           | 0,730          | 22 | 1,230           | 1,040          | 15 |
| Max. II<br>267   | 0,950           | 0,770          | 19 | 1,300           | 1,090          | 15 |
| Max. III<br>372  | 0,310           | 0,260          | 16 | 0,430           | 0,365          | 15 |
| Max. IV<br>445   | 0,358           | 0,285          | 20 | 0,494           | 0,407          | 17 |

| Wellen-<br>länge | Dosis: 24000 r  |                |    |                 |                |    |
|------------------|-----------------|----------------|----|-----------------|----------------|----|
|                  | 0,4 mg / 100 ml |                |    | 0,8 mg / 100 ml |                |    |
|                  | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% |
| Max. I<br>223    | 0,306           | 0,140          | 54 | 0,042           | 0,364          | 45 |
| Max. II<br>267   | 0,324           | 0,142          | 56 | 0,634           | 0,396          | 42 |
| Max. III<br>372  | 0,105           | 0,055          | 48 | 0,223           | 0,135          | 39 |
| Max. IV<br>445   | 0,121           | 0,048          | 60 | 0,257           | 0,136          | 47 |

| Wellen-<br>länge | Dosis: 24000 r  |                |    |                 |                |    |
|------------------|-----------------|----------------|----|-----------------|----------------|----|
|                  | 1,2 mg / 100 ml |                |    | 1,6 mg / 100 ml |                |    |
|                  | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% |
| Max. I<br>223    | 0,935           | 0,572          | 39 | 1,230           | 0,890          | 28 |
| Max. II<br>267   | 0,950           | 0,633          | 33 | 1,300           | 0,960          | 26 |
| Max. III<br>372  | 0,310           | 0,215          | 31 | 0,430           | 0,326          | 24 |
| Max. IV<br>445   | 0,358           | 0,232          | 35 | 0,494           | 0,354          | 28 |

| Wellen-<br>länge | Dosis: 48000 r  |                |    |                 |                |    |
|------------------|-----------------|----------------|----|-----------------|----------------|----|
|                  | 0,4 mg / 100 ml |                |    | 0,8 mg / 100 ml |                |    |
|                  | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% |
| Max. I<br>223    | 0,320           | 0,141          | 56 | 0,631           | 0,284          | 55 |
| Max. II<br>267   | 0,331           | 0,077          | 77 | 0,668           | 0,280          | 59 |
| Max. III<br>372  | 0,108           | 0,024          | 22 | 0,217           | 0,110          | 49 |
| Max. IV<br>445   | 0,125           | 0,012          | 90 | 0,252           | 0,093          | 63 |

| Wellen-<br>länge | Dosis: 48000 r  |                |    |                 |                |    |
|------------------|-----------------|----------------|----|-----------------|----------------|----|
|                  | 1,2 mg / 100 ml |                |    | 1,6 mg / 100 ml |                |    |
|                  | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% |
| Max. I<br>223    | 0,950           | 0,440          | 54 | 1,240           | 0,670          | 46 |
| Max. II<br>267   | 0,960           | 0,437          | 54 | 1,300           | 0,710          | 45 |
| Max. III<br>372  | 0,313           | 0,163          | 48 | 0,430           | 0,260          | 40 |
| Max. IV<br>445   | 0,360           | 0,146          | 59 | 0,492           | 0,252          | 48 |

| Wellen-<br>länge | Dosis: 96000 r  |                |    |                 |                |    |
|------------------|-----------------|----------------|----|-----------------|----------------|----|
|                  | 0,4 mg / 100 ml |                |    | 0,8 mg / 100 ml |                |    |
|                  | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% |
| Max. I<br>223    | 0,320           | 0,154          | 52 | 0,631           | 0,232          | 63 |
| Max. II<br>267   | 0,331           | 0,034          | 90 | 0,668           | 0,160          | 76 |
| Max. III<br>372  | 0,108           | 0,005          | 95 | 0,217           | 0,055          | 75 |
| Max. IV<br>445   | 0,125           | 0,002          | 98 | 0,252           | 0,026          | 90 |

| Wellen-<br>länge | Dosis: 96000 r  |                |    |                 |                |    |
|------------------|-----------------|----------------|----|-----------------|----------------|----|
|                  | 1,2 mg / 100 ml |                |    | 1,6 mg / 100 ml |                |    |
|                  | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% |
| Max. I<br>223    | 0,950           | 0,378          | 60 | 1,240           | 0,499          | 60 |
| Max. II<br>267   | 0,960           | 0,283          | 70 | 1,300           | 0,459          | 65 |
| Max. III<br>372  | 0,315           | 0,109          | 65 | 0,430           | 0,192          | 55 |
| Max. IV<br>445   | 0,360           | 0,065          | 82 | 0,492           | 0,135          | 73 |

| Wellen-<br>länge | Dosis: 192000 r |                |     |                 |                |    |
|------------------|-----------------|----------------|-----|-----------------|----------------|----|
|                  | 0,4 mg / 100 ml |                |     | 0,8 mg / 100 ml |                |    |
|                  | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A%  | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% |
| Max. I<br>223    | 0,313           | 0,141          | 55  | 0,640           | 0,237          | 63 |
| Max. II<br>267   | 0,328           | 0,009          | 97  | 0,674           | 0,036          | 95 |
| Max. III<br>372  | 0,107           | 0,000          | 100 | 0,222           | 0,004          | 98 |
| Max. IV<br>445   | 0,126           | 0,002          | 98  | 0,255           | 0,001          | 99 |

| Wellen-<br>länge | Dosis: 192000 r |                |    |                 |                |    |
|------------------|-----------------|----------------|----|-----------------|----------------|----|
|                  | 1,2 mg / 100 ml |                |    | 1,6 mg / 100 ml |                |    |
|                  | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% |
| Max. I<br>223    | 0,900           | 0,328          | 64 | 1,200           | 0,412          | 66 |
| Max. II<br>267   | 0,970           | 0,120          | 88 | 1,350           | 0,259          | 81 |
| Max. III<br>372  | 0,314           | 0,034          | 89 | 0,430           | 0,093          | 78 |
| Max. IV<br>445   | 0,359           | 0,013          | 96 | 0,498           | 0,040          | 92 |

| Wellen-<br>länge | Dosis: 384000 r |                |     |                 |                |    |
|------------------|-----------------|----------------|-----|-----------------|----------------|----|
|                  | 0,4 mg / 100 ml |                |     | 0,8 mg / 100 ml |                |    |
|                  | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A%  | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% |
| Max. I<br>223    | 0,313           | 0,172          | 45  | 0,640           | 0,228          | 65 |
| Max. II<br>267   | 0,328           | 0,005          | 98  | 0,674           | 0,031          | 95 |
| Max. III<br>372  | 0,107           | 0,000          | 100 | 0,222           | 0,007          | 97 |
| Max. IV<br>445   | 0,126           | 0,001          | 99  | 0,255           | 0,005          | 98 |

| Wellen-<br>länge | Dosis: 384000 r |                |    |                 |                |    |
|------------------|-----------------|----------------|----|-----------------|----------------|----|
|                  | 1,2 mg / 100 ml |                |    | 1,6 mg / 100 ml |                |    |
|                  | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% |
| Max. I<br>223    | 0,900           | 0,286          | 68 | 1,200           | 0,408          | 66 |
| Max. II<br>267   | 0,970           | 0,055          | 94 | 1,350           | 0,154          | 89 |
| Max. III<br>372  | 0,314           | 0,003          | 99 | 0,430           | 0,016          | 96 |
| Max. IV<br>445   | 0,359           | 0,001          | 99 | 0,498           | 0,005          | 99 |

Tabelle II

$E_u$  Extinktion der unbestrahlten Lösung

$E_b$  Extinktion der bestrahlten Lösung

A% Abnahme der Extinktion in Prozent

| Wellen-<br>länge | 40 Min. UV      |       |    |                 |       |    |
|------------------|-----------------|-------|----|-----------------|-------|----|
|                  | 0,4 mg / 100 ml |       |    | 0,8 mg / 100 ml |       |    |
|                  | $E_u$           | $E_b$ | A% | $E_u$           | $E_b$ | A% |
| Max. I<br>223    | 0,297           | 0,249 | 16 | 0,608           | 0,574 | 6  |
| Max. II<br>267   | 0,316           | 0,258 | 18 | 0,650           | 0,570 | 12 |
| Max. III<br>372  | 0,102           | 0,089 | 14 | 0,211           | 0,198 | 6  |
| Max. IV<br>445   | 0,118           | 0,074 | 37 | 0,246           | 0,178 | 28 |

| Wellen-<br>länge | 40 Min. UV      |       |    |                 |       |    |
|------------------|-----------------|-------|----|-----------------|-------|----|
|                  | 1,2 mg / 100 ml |       |    | 1,6 mg / 100 ml |       |    |
|                  | $E_u$           | $E_b$ | A% | $E_u$           | $E_b$ | A% |
| Max. I<br>223    | 0,925           | 0,788 | 15 | 1,240           | 1,170 | 6  |
| Max. II<br>267   | 0,960           | 0,820 | 15 | 1,340           | 1,180 | 12 |
| Max. III<br>372  | 0,312           | 0,282 | 10 | 0,431           | 0,401 | 7  |
| Max. IV<br>445   | 0,359           | 0,259 | 28 | 0,492           | 0,385 | 22 |

| Wellen-<br>länge | 60 Min. UV      |                |    |                 |                |    |
|------------------|-----------------|----------------|----|-----------------|----------------|----|
|                  | 0,4 mg / 100 ml |                |    | 0,8 mg / 100 ml |                |    |
|                  | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% |
| Max. I<br>223    | 0,297           | 0,255          | 14 | 0,608           | 0,560          | 8  |
| Max. II<br>267   | 0,316           | 0,244          | 23 | 0,650           | 0,530          | 18 |
| Max. III<br>372  | 0,102           | 0,085          | 17 | 0,211           | 0,189          | 10 |
| Max. IV<br>445   | 0,118           | 0,060          | 49 | 0,246           | 0,151          | 39 |

| Wellen-<br>länge | 60 Min. UV      |                |    |                 |                |    |
|------------------|-----------------|----------------|----|-----------------|----------------|----|
|                  | 1,2 mg / 100 ml |                |    | 1,6 mg / 100 ml |                |    |
|                  | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% |
| Max. I<br>223    | 0,925           | 0,744          | 20 | 1,240           | 1,100          | 11 |
| Max. II<br>267   | 0,960           | 0,684          | 29 | 1,340           | 1,120          | 16 |
| Max. III<br>372  | 0,312           | 0,252          | 19 | 0,431           | 0,366          | 10 |
| Max. IV<br>445   | 0,359           | 0,195          | 46 | 0,492           | 0,348          | 29 |

| Wellen-<br>länge | 80 Min. UV      |                |    |                 |                |    |
|------------------|-----------------|----------------|----|-----------------|----------------|----|
|                  | 0,4 mg / 100 ml |                |    | 0,8 mg / 100 ml |                |    |
|                  | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% |
| Max. I<br>223    | 0,314           | 0,226          | 28 | 0,621           | 0,504          | 19 |
| Max. II<br>267   | 0,326           | 0,206          | 37 | 0,662           | 0,472          | 29 |
| Max. III<br>372  | 0,105           | 0,077          | 27 | 0,215           | 0,174          | 19 |
| Max. IV<br>445   | 0,119           | 0,049          | 59 | 0,250           | 0,113          | 55 |

| Wellen-<br>länge | 80 Min. UV      |                |    |                 |                |    |
|------------------|-----------------|----------------|----|-----------------|----------------|----|
|                  | 1,2 mg / 100 ml |                |    | 1,6 mg / 100 ml |                |    |
|                  | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% |
| Max. I<br>223    | 0,921           | 0,760          | 18 | 1,250           | 0,960          | 23 |
| Max. II<br>267   | 0,960           | 0,734          | 24 | 1,320           | 0,830          | 37 |
| Max. III<br>372  | 0,311           | 0,266          | 14 | 0,432           | 0,315          | 27 |
| Max. IV<br>445   | 0,359           | 0,195          | 46 | 0,495           | 0,229          | 54 |

| Wellen-<br>länge | 100 Min. UV     |                |    |                 |                |    |
|------------------|-----------------|----------------|----|-----------------|----------------|----|
|                  | 0,4 mg / 100 ml |                |    | 0,8 mg / 100 ml |                |    |
|                  | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% |
| Max. I<br>223    | 0,314           | 0,234          | 25 | 0,648           | 0,474          | 27 |
| Max. II<br>267   | 0,326           | 0,215          | 34 | 0,697           | 0,430          | 38 |
| Max. III<br>372  | 0,105           | 0,080          | 24 | 0,223           | 0,163          | 27 |
| Max. IV<br>445   | 0,119           | 0,044          | 63 | 0,257           | 0,086          | 67 |

| Wellen-<br>länge | 100 Min. UV     |                |    |                 |                |    |
|------------------|-----------------|----------------|----|-----------------|----------------|----|
|                  | 1,2 mg / 100 ml |                |    | 1,6 mg / 100 ml |                |    |
|                  | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% |
| Max. I<br>223    | 0,921           | 0,722          | 22 | 1,250           | 0,934          | 25 |
| Max. II<br>267   | 0,960           | 0,638          | 34 | 1,300           | 0,855          | 34 |
| Max. III<br>372  | 0,311           | 0,240          | 23 | 0,432           | 0,321          | 26 |
| Max. IV<br>445   | 0,359           | 0,139          | 61 | 0,495           | 0,218          | 56 |

| Wellen-<br>länge | 120 Min. UV     |                |    |                 |                |    |
|------------------|-----------------|----------------|----|-----------------|----------------|----|
|                  | 0,4 mg / 100 ml |                |    | 0,8 mg / 100 ml |                |    |
|                  | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% |
| Max. I<br>223    | 0,327           | 0,229          | 30 | 0,648           | 0,457          | 29 |
| Max. II<br>267   | 0,330           | 0,190          | 42 | 0,697           | 0,395          | 43 |
| Max. III<br>372  | 0,108           | 0,072          | 33 | 0,223           | 0,152          | 32 |
| Max. IV<br>445   | 0,125           | 0,030          | 76 | 0,257           | 0,068          | 75 |

| Wellen-<br>länge | 120 Min. UV     |                |    |                 |                |    |
|------------------|-----------------|----------------|----|-----------------|----------------|----|
|                  | 1,2 mg / 100 ml |                |    | 1,6 mg / 100 ml |                |    |
|                  | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% | E <sub>u</sub>  | E <sub>b</sub> | A% |
| Max. I<br>223    | 0,910           | 0,712          | 22 | 1,230           | 0,955          | 22 |
| Max. II<br>267   | 0,970           | 0,618          | 36 | 1,310           | 0,815          | 38 |
| Max. III<br>372  | 0,314           | 0,237          | 25 | 0,429           | 0,316          | 26 |
| Max. IV<br>445   | 0,362           | 0,133          | 63 | 0,491           | 0,161          | 67 |

## Bestrahlung von Riboflavin in Pufferlösungen.

Eine wichtige Eigenschaft von Riboflavin ist seine Lichtempfindlichkeit. Untersuchungen von O. WARBURG und W. CHRISTIAN<sup>47</sup>, F. KARRER und Mitarbeiter haben gezeigt, daß die Richtung der Reaktion bei Belichtung sehr stark vom pH-Wert abhängt. Deshalb wurden in den folgenden Versuchen Riboflavinlösungen verschiedener pH-Werte Röntgen- und UV-Strahlen ausgesetzt.

### A r b e i t s m e t h o d e.

Es wurde mit einem Universalpuffer nach BRITTON-ROBINSON gearbeitet, der aus folgenden Lösungen besteht:

1. Aus einer Stammlösung von:

m/25 Phosphorsäure, m/25 Essigsäure und m/25 Borsäure.

2. Aus einer Komplementärkomponente zur Stammlösung:

n/5 Natronlauge.

Der gewünschte pH-Wert der einzelnen Pufferlösungen wurde mit dem Philips pH-Meßgerät GM eingestellt. 100 ml Lösung enthielten 800  $\mu$ g Riboflavin. Als einleitender Versuch diente die Untersuchung einer Probe, bei der 800  $\mu$ g Riboflavin in 100 ml n/10 Salzsäure gelöst waren (pH-Wert dieser Lösung: 1,08).

Pufferlösungen mit folgendem pH-Wert wurden untersucht:

- |              |              |               |              |
|--------------|--------------|---------------|--------------|
| 1. pH = 2,01 | 2. pH = 3,64 | 3. pH = 6,04  | 4. pH = 7,36 |
| 5. pH = 8,40 | 6. pH = 9,96 | 7. pH = 11,43 |              |

Ferner wurde Riboflavin in den einzelnen Komponenten des Puffers (Phosphorsäure, Essigsäure, Borsäure) bestrahlt. Je 100 ml enthielten 0,8 mg Riboflavin.

Im Verlauf dieser Versuchsreihe wurde bei der Röntgenbestrahlung mit einer Dosis von 48000 r gearbeitet. Mit UV-Licht wurde 60 Minuten lang bestrahlt.

Ein Versuch, das Absorptionsspektrum des in n/10 Natronlauge gelösten Riboflavin aufzunehmen, scheiterte, da die Substanz in dem stark alkalischen Milieu während der Messung zerstört wurde.

### Ergebnisse der Bestrahlung in Pufferlösungen.

Die Abbildungen 13 - 27 zeigen die graphische Darstellung der UV-Spektren von unbestrahltem und bestrahltem Riboflavin in Pufferlösungen. Auch hier wurde die Wirkungsweise der Röntgenstrahlen mit der des UV-Lichts verglichen. Einen Aufschluß über die Wirkungsweise des Puffers gibt Abbildung 13. Die m/25 Phosphorsäure mit einem pH-Wert von 1,89 zeigt keinerlei stabilisierende Wirkung auf Riboflavin; die m/25 Borsäure (pH = 5,63) wirkt als Lösungsmittel ähnlich wie Wasser mit einem pH von 5,60 (vergl. Abb. 5). Im Gegensatz dazu scheint jedoch die m/25 Essigsäure (pH = 3,64) stark zu stabilisieren. Bei Verwendung von n/10 HCl als Lösungsmittel (pH = 1,08) trat bei einer Dosis von 48000r noch keine Änderung im Spektrum ein. Erst bei 96000 und 384000r ist hier ein Effekt zu beobachten, der aber weitaus geringer ist als der in wässriger Lösung (Abb. 14 u. 15, vergl. auch Abb. 5 u. 6). Die Pufferlösung mit einem pH von 2,01 stabilisierte das Vitamin ebenfalls noch bei einer Dosis von 48000r. Die Pufferlösungen mit einem pH-Wert von 3,64 - 11,43 wirkten im Vergleich zur wässrigen Lösung stark stabilisierend auf Riboflavin (Abb. 16 - 21). Hierbei ist interessant, daß im neutralen bzw. alkalischen Bereich keine zunehmende Empfindlichkeit gegenüber Röntgenstrahlen feststellbar war.

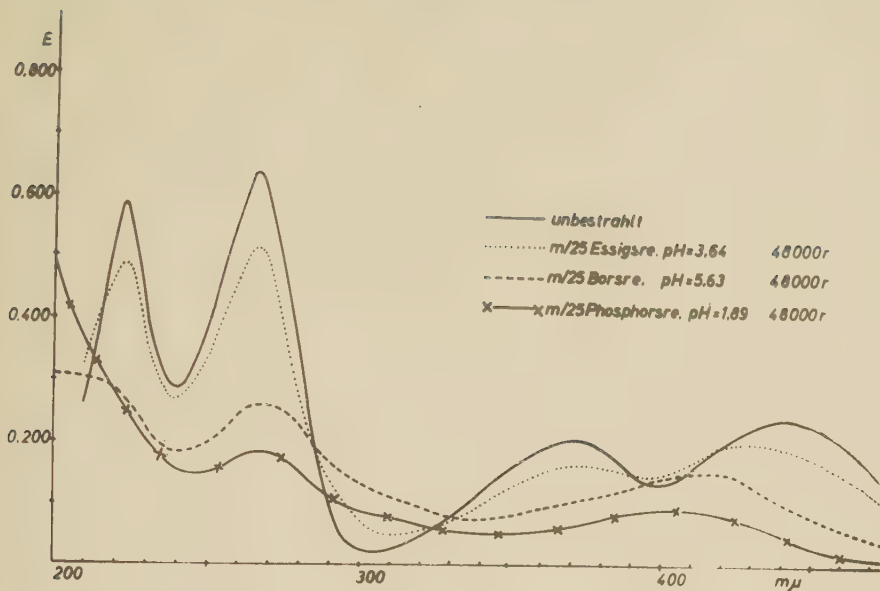


Abb. 13

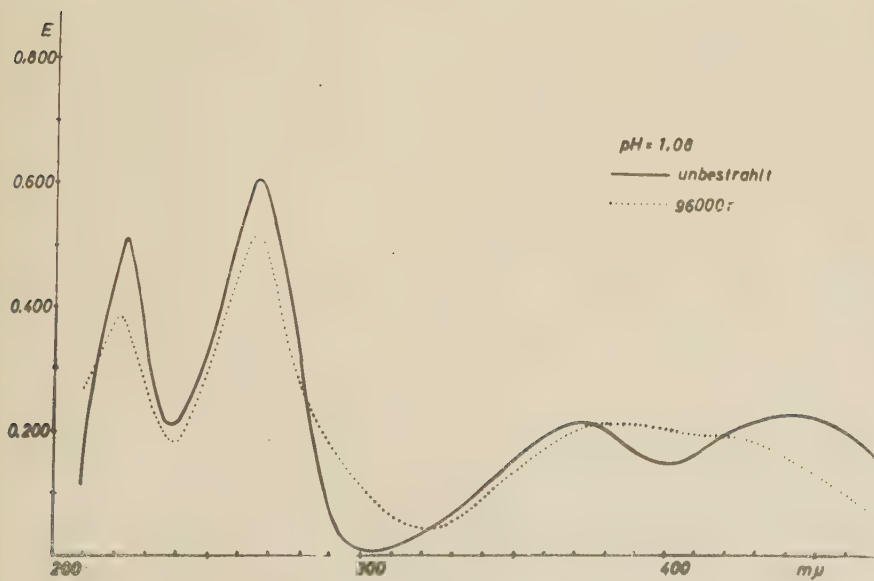


Abb. 14

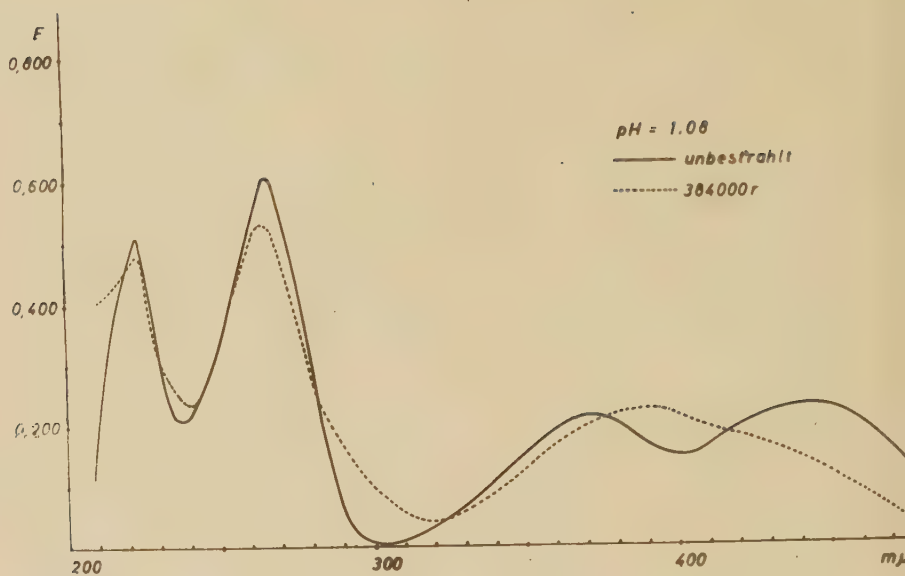


Abb. 15

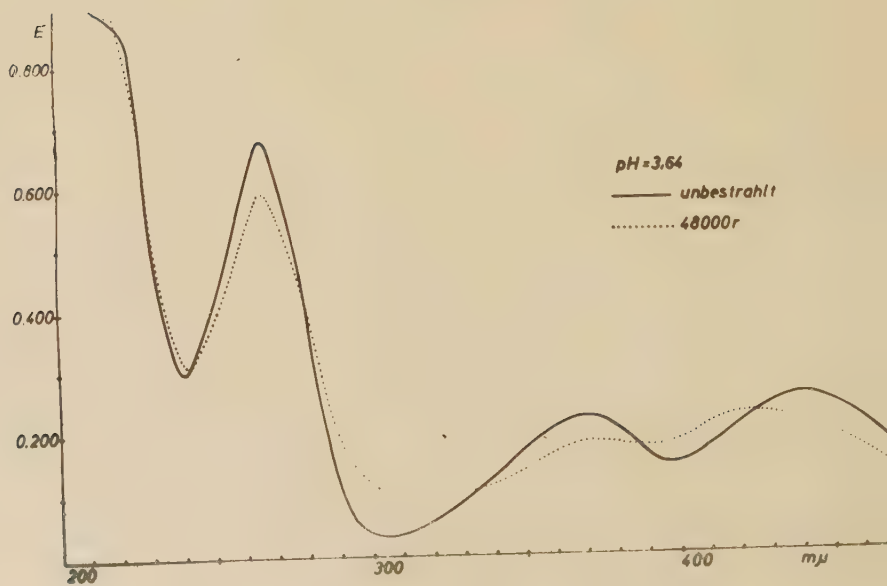


Abb. 16

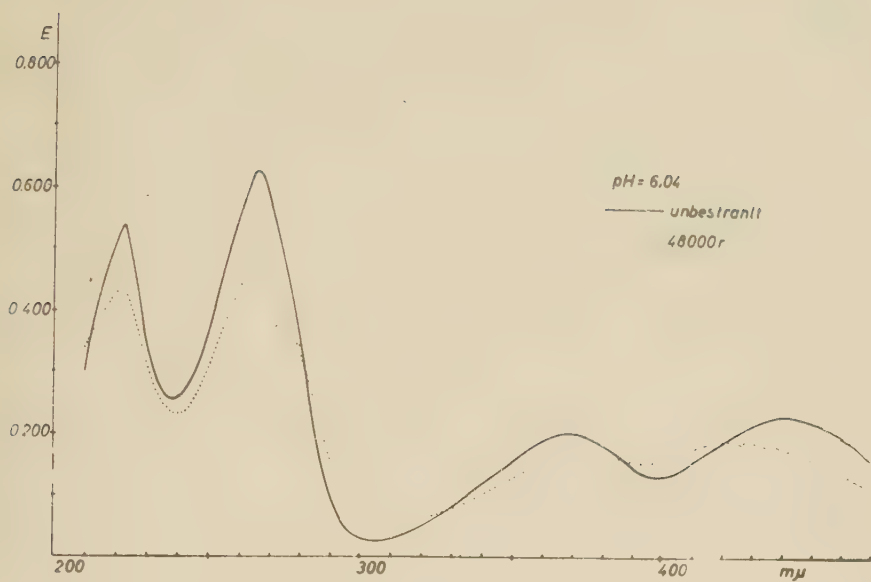


Abb. 17

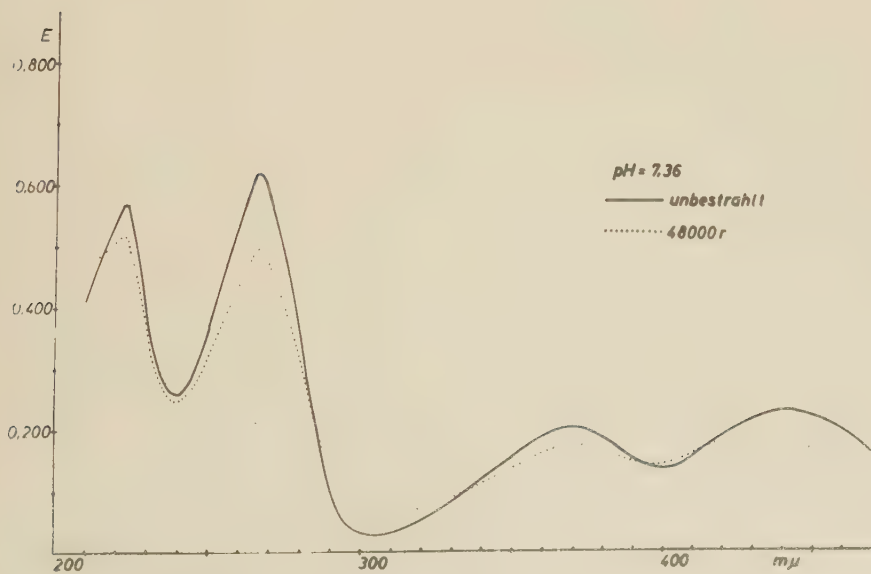


Abb. 18

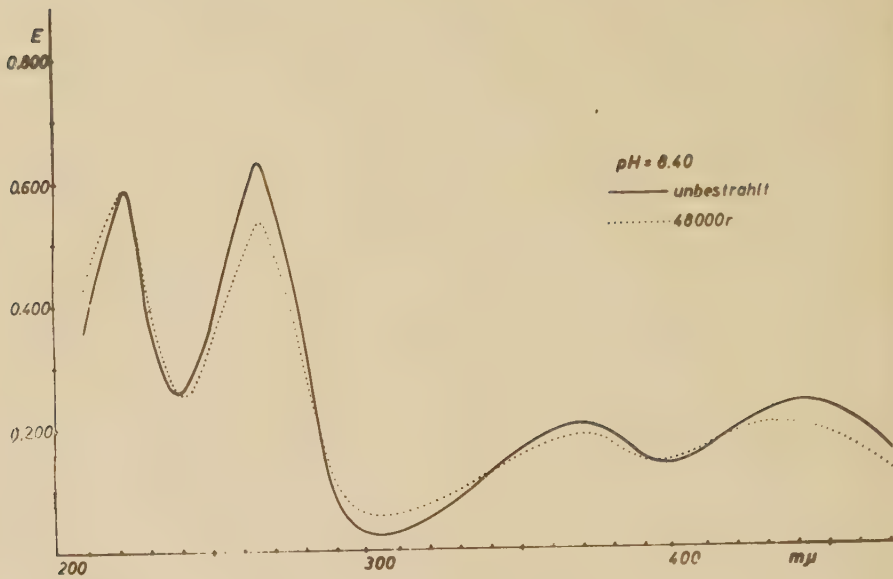


Abb. 19

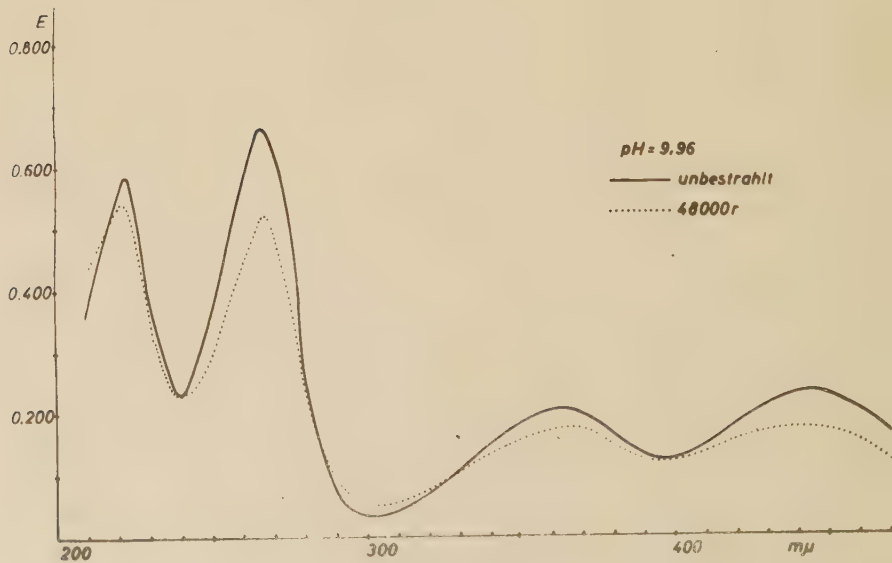


Abb. 20

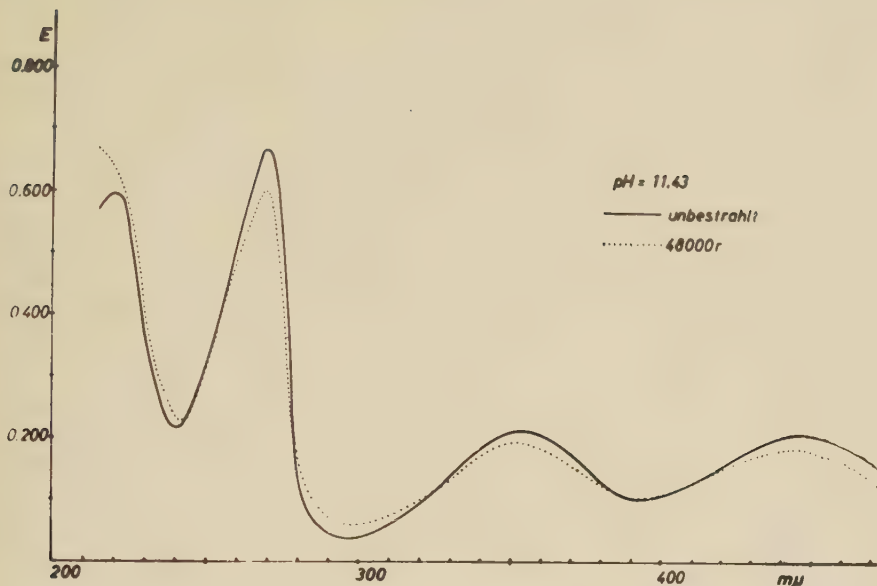


Abb. 21

Bei einer 60 Minuten dauernden UV-Bestrahlung von Riboflavin in verschiedenen Pufferlösungen (pH 6,04 - 11,43) konnte kaum ein Unterschied gegenüber der Wirkung in wässriger Lösung gefunden werden. Es kam hier wieder zu einem deutlichen Abbau der langwelligen Bande bei 445 mμ, der bei pH 7,36, 8,40 und 9,96 stärker war als in wässriger Lösung (Abb. 24, 25 u. 26). Bei dreifacher Dauer der Bestrahlung (180 Minuten) wurde Riboflavin, in n/10 HCl gelöst (pH 1,08), stark zerstört (Abb. 22). Besonders auffallend ist hier der Abbau des Maximums bei 445 mμ.

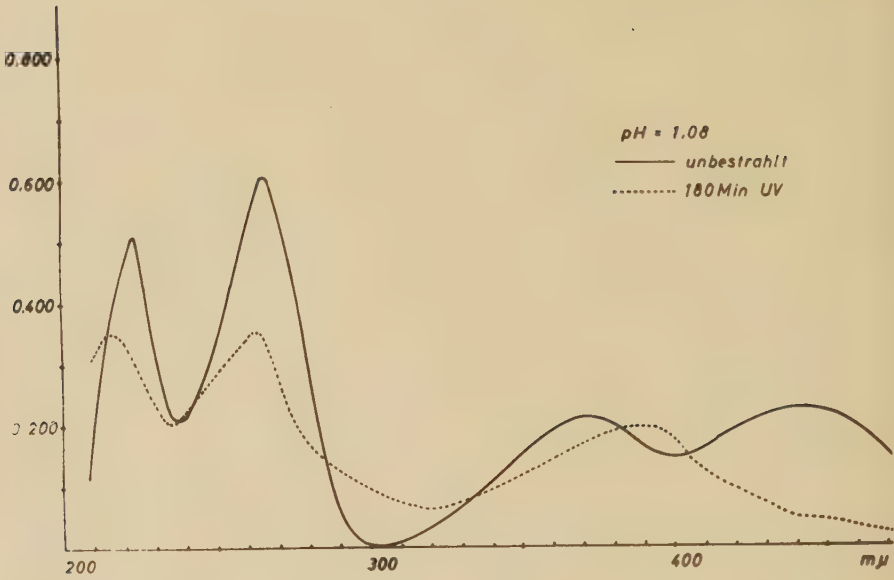


Abb. 22

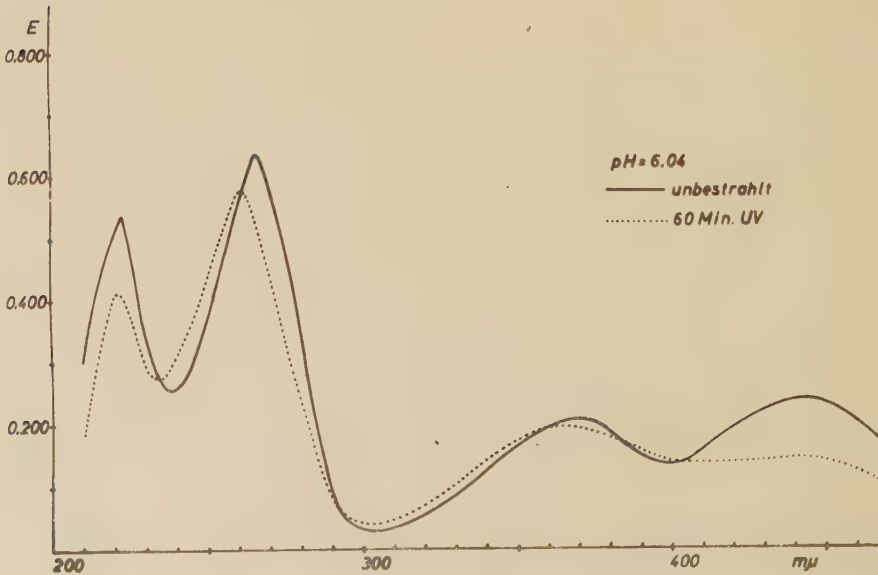


Abb. 23

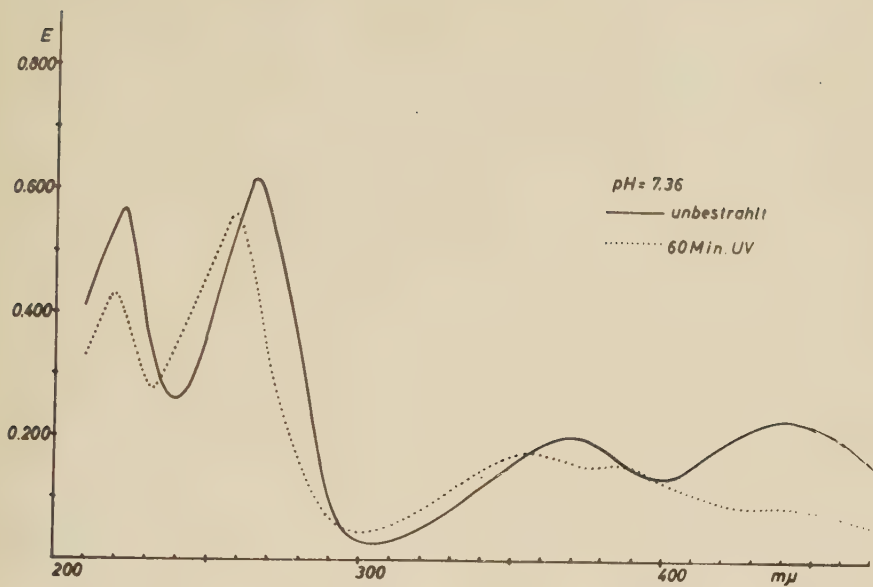


Abb. 24

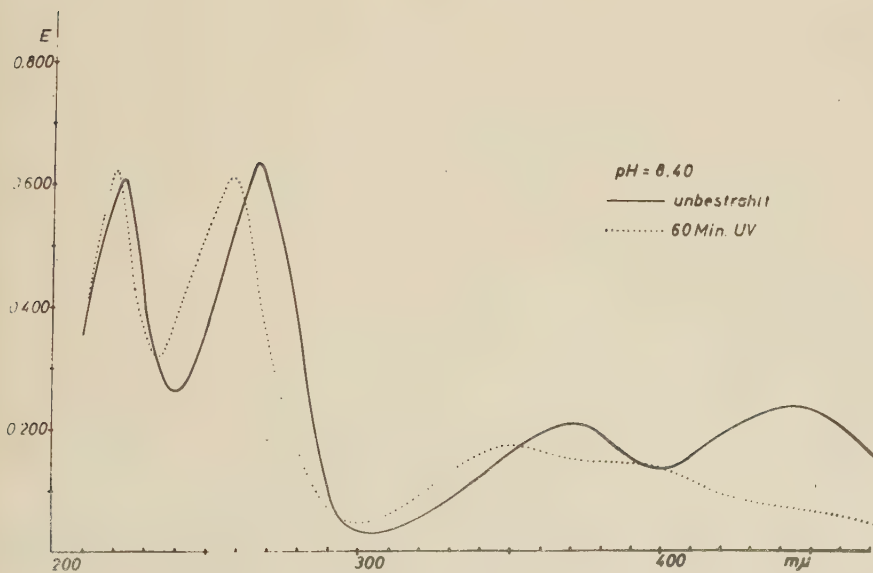


Abb. 25

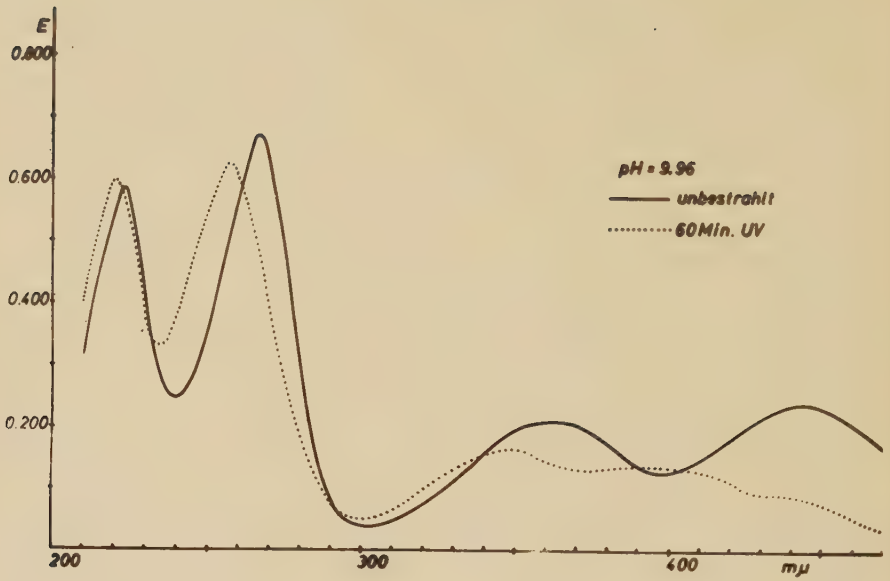


Abb. 26

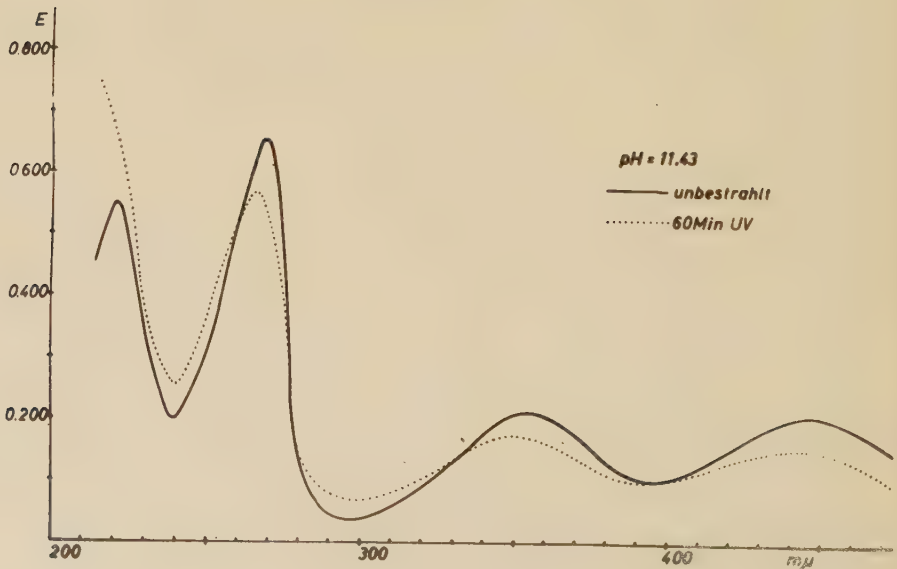


Abb. 27

Abhängigkeit der Absorptionsmaxima und -minima von der Dosis.

Einen Überblick über die Dosisabhängigkeit der Maxima und Minima gibt die graphische Darstellung (Abb. 28 - 31, Abszisse: Dosis in r, Ordinate: Extinktion). Bei den vier Maxima und einem Minimum ( $239 \text{ m}\mu$ ) nehmen bei steigender Dosierung die Extinktionswerte ab. Sämtliche Maxima und Minima sind bei Bestrahlung mit der Dosis 192000r bereits so weit abgebaut, daß durch Erhöhung der Dosis auf 384000r keine weitere Wirkung mehr eintritt (Abb. 28). Die Minima bei 302 und  $398 \text{ m}\mu$  lassen bei Anwendung bestimmter Dosen (12000r, 24000r und 48000r) einen deutlichen Anstieg erkennen (Abb. 29).

Bei Bestrahlung mit UV-Licht sinken sämtliche Maxima mit zunehmender Dauer der Bestrahlung ab. Die Stärke der Abnahme ist aber sehr verschieden; so wird das Maximum bei  $372 \text{ m}\mu$  im Vergleich zu den übrigen drei Maxima nur wenig abgebaut. Die Minima zeigen zunächst alle einen leichten Anstieg. (Abb. 30 u. 31)

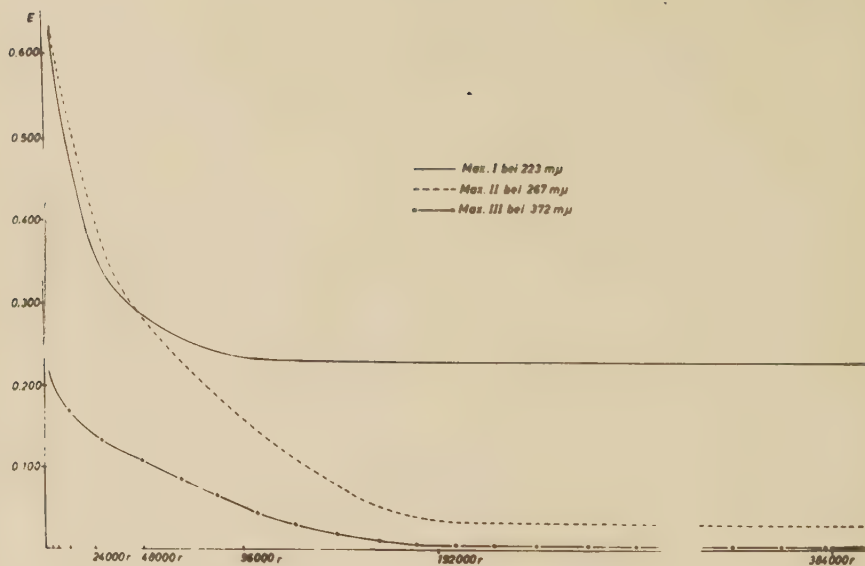


Abb. 28

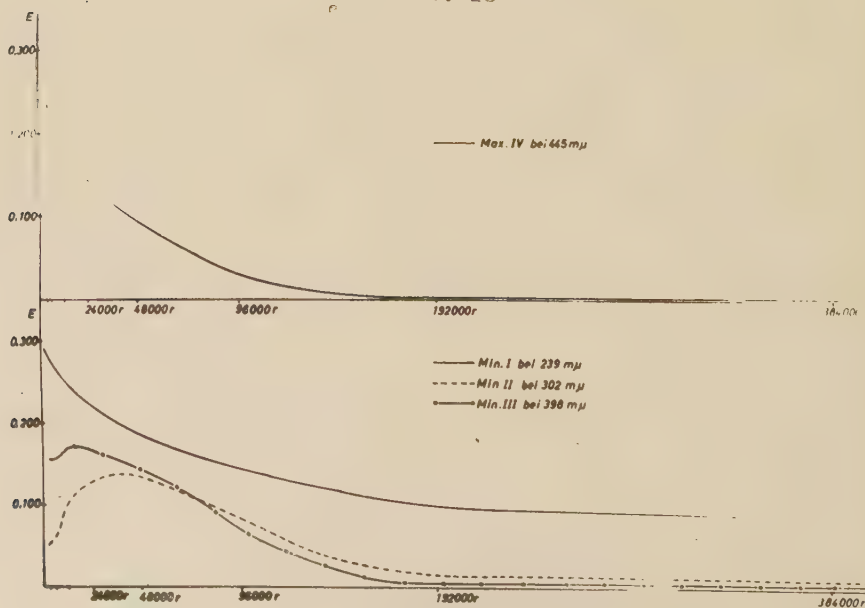


Abb. 29

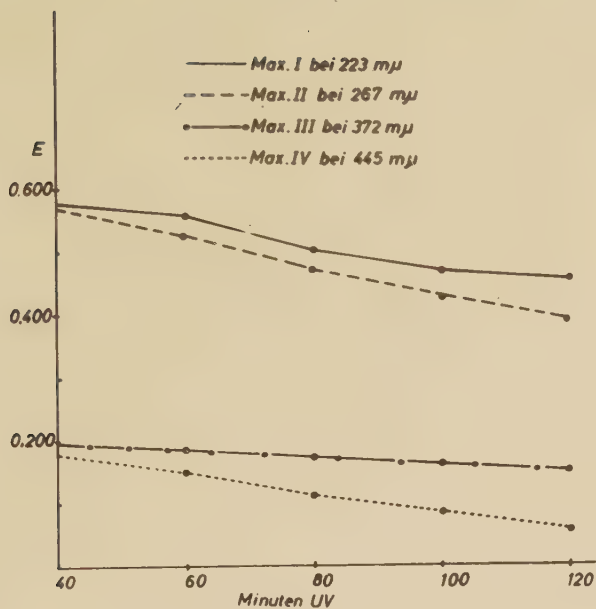


Abb. 30

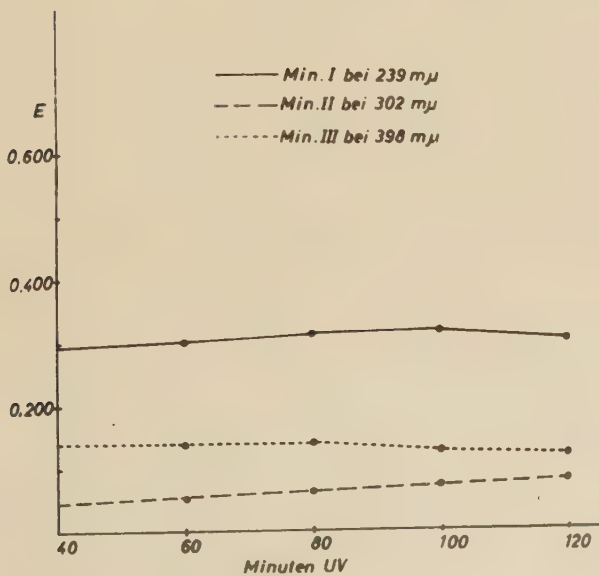


Abb. 31

### Z u s a m m e n f a s s u n g .

Riboflavinlösungen wurden einer Röntgenstrahlung ausgesetzt, die bei 200 kV und 20 mA erzeugt wurde. Die dabei eintretenden Veränderungen im Riboflavinmolekül konnten zum Teil durch die Untersuchung der UV-Absorptionsspektren anschaulich gemacht werden. Eine beginnende Zersetzung ist bei 3000r, die vollkommene Zerstörung aber erst bei 192000r feststellbar. Die papierchromatographische Untersuchung der Bestrahlungsprodukte zeigte einen grundsätzlichen Unterschied zwischen der Wirkungsweise der Röntgenstrahlen und der des UV-Lichts. Das UV-Licht hat demnach eine ähnliche, aber stärkere Wirkung auf Riboflavin wie das sichtbare Licht. Es kommt bei schwachsaurer Lösung zu einer Bildung von Lumiflavin und Lumichrom. Bei der röntgenbestrahlten Vitaminlösung konnte jedoch kein Lumichrom nachgewiesen werden. Auffallend war hier auch das Auftreten von zahlreichen Flecken mit niedrigen  $R_F$ -Werten. In Pufferlösungen war Riboflavin bei einer Bestrahlung mit 48000r bis zu einem pH-Wert von 2,01 vollkommen stabil. Von pH 3,64 an trat eine leichte Zerstörung ein, die aber bei steigendem pH-Wert nicht zunimmt. Weder in neutraler noch in alkalischer Lösung (pH 11,43) ändert sich diese relative Stabilität von Riboflavin im Puffer.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Dr. R. Dyroff für die freundliche Überlassung des Themas und den Herren Dr. R. Dittmeyer, Dr. H.J. Maurer und Dr. A. Reuss für ihre liebenswürdige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und anregende Diskussionen meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Die Quarz-Analysenlampe wurde dankenswerterweise von der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Verfügung gestellt.

Für die Überlassung der Analysenwaage danke ich dem Universitätsbund Erlangen.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s .

1. Anderson, R.S. u. B. Harrison: J. Gen. Physiol. 27, 69 (1943)  
(Ref.: Nucleonics 5, No. 3, 56 (1949))
2. Banga, J. u. Szent-A. Györgyi: Biochem. Z. 246, 203 (1932)
3. Banga, J. u. L. Vargha: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 210,  
228 (1932)
4. Birkofer, L. u. A. Birkofer: Z. Naturforsch. 3b, 136 (1948)
5. Bleyer, B. u. Kallmann: Biochem. Z. 155, 54 (1925)
6. Blyth, A. W.: J. Chem. Soc. (1879), 530
7. Bocher, E. L.: J. Biol. Chem. 102, 29 (1933; 107, 591 (1934))
8. Burch u. Mitarbeiter: J. biol. Chem. 175, 457 (1948)
9. Crammer, I. L.: Nature 161, 349 (1948)
10. Day, P. L. u. W. J. Darby: Biochem. J. 32, 1171 (1938)
11. Demole, V.: Z. Vit.-Forsch. 7, 138 (1938)
12. Ellinger, P. u. Koschara, W.: Ber. 66, 315 (1933)
13. Emmett, A. D. u. L. H. McKin: J. Biol. Chem. 32, 409 (1917)
14. Euler von, H. u. E. Adler: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.  
223, 105 (1934)
15. Euler von, H., P. Karrer u. M. Malmberg, K. Schöpp, F. Benz,  
B. Becker u. P. Frei: Helv. chim. Acta 18, 522 (1935)
16. Porter, W. u. P. Karrer: Helv. chim. Acta 36, 1530 (1953)
17. Gehrig, D.: Dissertation 1955 Univ.-Frauenklinik Erlan-  
gen
18. György, P. u. Mitarbeiter: Amer. J. Physiol. 122, 154 (1938)
19. Hais, I. M. u. L. Pecáková: Nature (London) 163, 768 (1949)
20. Hoppe-Seyler/Thierfelder: Handbuch der physiolog. u.  
patholog. chem. Analyse III/2 Berlin (1955)

21. Itter, S., E.R. Orent u. E.V. McCollum: J. Biol. Chem. 108,  
579 (1935)
22. Kailan, A.: Sitz. Ber. Akad. Wiss. (Wien) 120 /11a(1911):1213
23.     "         "         "         "         "         "         128 /11a(1917):8713
24.     "         "         "         "         "         "         130 /11a(1920):307,  
469
25.     "         "         "         "         "         "         131 /11a(1922):569
26.     "         "         "         "         "         "         133 /11a(1924):477
27. Karrer, P., H. Salomon u. Mitarbeiter: Helv. chim. Acta 17,  
1010 (1934)
28. Karrer, P. u. K. Schöpp: Helv. chim. Acta 17, 735, 771 (1934)
29. Karrer, P. u. Mitarbeiter: Helv. chim. Acta 18, 266 (1935)
30. Karrer, P. u. Mitarbeiter: Helv. chim. Acta 18, 426 (1935)
31. Koschara, W.: Ber. 67, 761 (1934)
32. Kuhn, R., P. György u. T. Wagner-Jauregg: Ber. 66, 1035 (1933)
33. Kuhn, R., P. György u. T. Wagner-Jauregg: Ber. 66, 317, 576,  
1034 (1934)
34. Kuhn, R. u. H. Rudy: Ber. 66, 1950 (1933)
35. Kuhn, R. u. H. Rudy: Ber. 67, 1826, 1936 (1934)
36. Kuhn, R. u. H. Kaltschmitt: Ber. 68, 128 (1935)
37. Kuhn, R. u. H. Rudy: Ber. 68, 383 (1935)
38. Kuhn, R., K. Reinemund u. K. Ströbele: Ber. 68, 1765 (1935)
39. Osborne, T. B. u. L. B. Mendel: J. Biol. Chem. 15, 311 (1913)
40. Proctor, B. E. u. S. A. Goldblith: Nucleonics 5, No. 2, 50  
(1949)
41. Proctor, B. E. u. S. A. Goldblith: Nucleonics 5, No. 3, 56  
(1949)

42. Schopfer, W.H.: *Helv.chim.Acta* 27, 1017 (1944)
43. Stepp-Kuhnau-Schröder, Vitamine. 7.Auflage, Seite 252  
Stuttgart (1952)
44. Tchaperoff, I.C.G.: *Can.J.Research* 24 E, 49 (1946)  
(Chem.Abstr. Ref. 5093<sup>3</sup> (1949))
45. Vogel-Knobloch: *Chemie u.Technik d.Vitamine II/1* 129  
3.Aufl.Stuttgart 1955
46. Warburg, O.u.W.Christian: *Biochem.Z.* 254, 438 (1932)
47. Warburg, O.u.W.Christian: *Biochem.Z.* 258, 496 (1933)
48. Whitby, L.G.: *Biochem.J.* 50, 433 (1952), *Nature* 166,  
479 (1950)
49. Wolfangel, G.: *Dissertation 1955 Univ.-Frauenklinik*  
Erlangen

L e b e n s l a u f.

Am 26. Oktober 1931 wurde ich als Sohn des Lehrers Anton Rüfer und seiner Ehefrau Rosa Rüfer, geborene Handvest, in Nürnberg geboren. Von 1937 bis 1941 besuchte ich die Volksschule in Nürnberg und anschließend das dortige Neue Gymnasium. 1943 trat ich in die Oberrealschule in Landsberg am Lech über und legte dort am 17. Juli 1951 die Reifeprüfung ab. Nach dem Studium der Zahnheilkunde an der Universität Erlangen erhielt ich am 21. Juli 1955 die Approbation als Zahnarzt.









